

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE ABDELHAMID IBN BADIS – MOSTAGANEM



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Domaine : SNV
Filière : Sciences Agronomiques
Spécialité : Sciences et Technologies Alimentaires

THÈSE

PRESENTEE POUR L'OBTENTION DE DIPLOME DE
DOCTORAT 3^{ème} cycle LMD

Par
M. KHELIFI Haroune

THÈME

**Effets inhibiteurs des extraits de *Thymus vulgaris* sur
Streptococcus thermophilus et *Lactobacillus bulgaricus*,
impact sur la qualité et la stabilité d'un lait fermenté étuvé.**

Soutenu publiquement le : 27/01/2022

Devant le Jury :

M. DJIBAOUI Rachid	Pr	Président	Univ. Mostaganem
M. BEKADA Ahmed Med Ali	Pr	Directeur de thèse	Univ. Tissemsilt
M. AIT SAADA Djamel	MCA	Co-directeur de thèse	Univ. Mostaganem
M. KATI Djamel Edine	Pr	Examineur	Univ. Béjaïa
M. BENABDELMOUMENE Djilali	MCA	Examineur	Univ. Mostaganem

Laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition

Année universitaire : 2021-2022

Remerciements

Ce manuscrit représente l'aboutissement d'un cheminement personnel mais surtout d'un travail collectif et de beaucoup d'échanges. Je tenais absolument à remercier de nombreuses personnes.

Tous mes remerciements vont à mes directeurs de recherche, **Mr Ait Saada Djamel** directeur du laboratoire de Technologie Alimentaire et de Nutrition et le professeur microbiologiste **Mr Bekada Ahmed Mohamed Ali**. Vous avez été mon équipe encadrante pendant ces cinq années et vous m'avez transmis, sans jamais aucune limite vos savoir-faire. Avec chacun vos expertises, vos spécialités et vos personnalités, vous avez rendu cette expérience très riche scientifiquement, professionnellement et humainement parlant. Merci pour les nombreuses discussions techniques, votre accompagnement, votre patience, votre écoute, votre soutien et votre disponibilité. Merci également de m'avoir permis d'explorer avec une certaine liberté, de l'autonomie et de la créativité.

J'adresse ensuite mes remerciements au président de jury le Professeur **Djibaoui Rachid** et aux examinateurs ; Mr **Kati djamel Eddine**, Mr **Moghtet Snoussi** et Mr **Djilali Benabdelmoumene** pour leurs conseils précieux.

Ce travail a été effectué au Laboratoire Technologie Alimentaire et Nutrition à l'université Abdelhamid Ibn Badis de Mostaganem Algérie. Ma profonde gratitude et ma grande reconnaissance vont à l'équipe de recherche du laboratoire TAN pour leurs conseils scientifiques lors des réunions particulièrement au :

- **Pr SELSELET-ATTOU Ghalem**
- **Pr. BOUDEROUA Kaddour**
- **Pr CHERIGUENE Abderrahim**
- **Mme BELKACEMI Louiza**

Mes sincères remerciements vont également à **Mr RAMDANI Hareth** (directeur de l'Institut National Spécialisé de la formation professionnelle, Sétif) pour m'avoir permis de mener une partie de mon travail au sein du laboratoire de contrôle de qualité des industries agroalimentaires, merci beaucoup pour ton soutien et tes encouragements.

Dédicace

A l'achèvement du long travail qu'a nécessité cette thèse, je dédie cette thèse

- A Ma grand-mère Allah yarhamha paix à son âme qu'ALLAH lui fasse Miséricorde et lui ouvre les portes du paradis.
- A mes parents pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire ; Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien infallible, que dieu vous procure bonne santé et longue vie.
- A celle qui m'a soutenue tout au long de ce projet : Mon épouse pour ses sacrifices, son amour et sa tendresse.
- A mes deux étoiles filantes : Israa et Açil.
- A mes sœurs et à mon frère Salah eddine.

Valorisation scientifique

Le travail mené dans cette thèse a fait l'objet de publication et communications nationales et internationales suivantes :

1. Publication internationale

Haroune Khelifi*, Djamel Ait Saada, Ahmed Mohamed Ali Bekada, Nafissa Dehimeche.

Production and quality assessment of a set-style yogurt fortified with low concentrations of *Thymus vulgaris* phenolic extracts, South Asian Journal of Experimental Biology, Vol 8, No 6 (2018), 223-234 [https://doi.org/10.38150/sajeb.8\(6\).p223-234](https://doi.org/10.38150/sajeb.8(6).p223-234)

2. Communications internationales

Haroune Khelifi*, Djamel Ait Saada, Ahmed Mohamed Ali Bekada. Impact of *Thymus vulgaris* extracts incorporation on yogurt quality, the third international conference on microbial ecology (ATEMiii), march 17th -19th 2018, Hammamet, Tunisia.

Haroune Khelifi*, Djamel Ait Saada, Ahmed Mohamed Ali Bekada. Effect of phenolic compounds extracted from *Thymus vulgaris* on yogurt starter cultures, International Symposium on "Food Security and Sustainable Development in Semi- Arid Environments", 08-10 December 2018, Sétif, Algeria

Haroune Khelifi*, Djamel Ait Saada, Ahmed Mohamed Ali Bekada. In vitro investigation into the impact of *Thymus vulgaris* phenolic extracts on yogurt starter cultures 1st international conference on biodiversity in service of biotechnologies. 9-10 march 2020, Mila, Algeria.

3. Communications nationales

Haroune Khelifi*, Djamel Ait Saada, Ahmed Mohamed Ali Bekada, Nafissa Dehimeche.

Antimicrobial effect of *Thymus vulgaris* L phenolic extracts on yogurt starter cultures, national seminar: sustainability for our food, health and environment 15,16 January 2018, Bejaia, Algeria.

liste des abréviations

µg	:	Microgramme
CI₅₀	:	Concentration inhibitrice médiane
DL50	:	Dose Létale 50
EPS	:	Exopolysaccharides.
FDA	:	Food and Drug Administration.
GRAS	:	Generally Recognized As Safe.
HES	:	Huiles essentielles
LAB	:	Lactic Acid Bacteria.
<i>Lb</i>	:	<i>Lactobacillus</i>
LPH	:	Lactase-phloridzine hydrolase
MCV	:	Maladies cardiovasculaires
MGLA	:	Matière grasse laitière anhydre
ml	:	Millilitre
MPa	:	Mégapascal
NADPH	:	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
OVA	:	Ovalbumine
PAL	:	Phénylalanine ammonia-lyase
ROS	:	Reactive oxygen species
<i>St</i>	:	<i>Streptococcus</i>
USDA	:	United States Department of Agriculture
PPs	:	Polyphénols
HPLC	:	High-Performance Liquid Chromatography
CPT	:	Composés phénoliques Totaux
CMI	:	Concentration minimale inhibitrice
CMB	:	Concentration minimale bactéricide
UFC	:	Unités formant colonies
MRS	:	Gélose de Man, Rogosa, Sharpe
M17	:	Gélose M17
D°	:	Degré Dornic

Liste des tableaux

Tableau 1. Répartition des principales espèces du thym en Algérie.....	21
Tableau 2. Préparation des concentrations des extraits de <i>T. vulgaris</i>	53
Tableau 3. Screening phytochimique des extraits aux solvants à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i>	61
Tableau 4. Teneurs en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits aqueux aux solvants à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i>	62
Tableau 5. Profil en composés phénoliques des extraits aux solvants à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i>	63
Tableau 6. Activités antimicrobiennes démontrées par le test de diffusion sur disques des extraits phénoliques de <i>Thymus vulgaris</i> chez <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	72
Tableau 7. Taux d'inhibition développés par les extraits phénoliques <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis à la croissance de <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	76
Tableau 8. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> sur <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i> par la méthode de contact direct.....	78
Tableau 9. Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis au <i>St. thermophilus</i>	81
Tableau 10. Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis au <i>Lb.bulgaricus</i>	82
Tableau 11. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis au développement de cultures starter.....	84
Tableau 12. Rapports CMB / CMI et interprétation de l'effet.....	87
Tableau 13. Variations des valeurs de pH des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i> au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.....	93
Tableau 14. Variations de l'acidité (°D) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i> au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.....	97
Tableau 15. Variations de la viscosité apparente(Kg/ms) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i> au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.....	102
Tableau 16. Variations du nombre de <i>St. thermophilus</i> (UFC/ml) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i> au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.....	110
Tableau 17. Variations du nombre de <i>Lb. Bulgaricus</i> (UFC/ml) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i> au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.....	114
Tableau 18. Variation sensorielle du goût acide (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différent types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	116
Tableau 19. Variation sensorielle du goût de fraîcheur (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différent types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	117
Tableau 20. Variation sensorielle de la cohésivité (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différents types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	119
Tableau 21. Variation sensorielle de l'adhésivité (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différent types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	120
Tableau 22. Variation sensorielle de l'odeur (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différents types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	122
Tableau 23. Variation sensorielle de l'arrière-goût (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différent types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	123
Tableau 24. Variation sensorielle de la couleur (somme des rangs) des laits fermentés additionnées de différent types d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	124

Liste des figures

Figure 1. Cellules de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> observées par microscopie électronique à balayage.....	08
Figure 2. Cellules de <i>Streptococcus thermophilus</i> observées par microscopie électronique à balayage.....	09
Figure 3. Représentation des interactions entre <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i> pendant la fermentation du yaourt.....	12
Figure 4. Schéma de fabrication de yaourt nature.....	16
Figure 5. <i>T. vulgaris</i>	22
Figure 6. Constituants phénoliques de <i>T.vulgaris</i>	23
Figure 7. Voie de biosynthèse des polyphénols chez les plantes.....	33
Figure 8. Structures chimiques des flavonoïdes.....	34
Figure 9. Absorption et métabolisme des polyphénols.....	37
Figure 10. Interrelation entre les bactéries probiotiques et les polyphénols.....	40
Figure 11. Zone de prélèvement du matériel végétal.....	44
Figure 12. Procédé d'extraction des polyphénols de <i>T. vulgaris</i>	46
Figure 13. Méthode d'activation des cultures starter de yaourt.....	52
Figure 14. Méthode de détermination de la CMI des extraits de thym.....	55
Figure 15. Méthode de la détermination de la CMB de l'extrait de thym vis-vis aux <i>streptococcus thermophilus</i> et <i>lactobacillus bulgaricus</i>	56
Figure 16. Diagramme de fabrication des yaourts étuvés enrichis en extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	59
Figure 17. Chromatogrammes des principaux composés phénoliques des extraits aux solvants à différentes polarités de <i>T. vulgaris</i>	64
Figure 18. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait à l'hexane aqueux de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis à la croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	73
Figure 19. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait hydroéthanolique de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis à la croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	73
Figure 20. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait hydrométhanolique de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis à la croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	74
Figure 21. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait aqueux de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis à la croissance de <i>St. thermophilus</i> et <i>Lb. bulgaricus</i>	74
Figure 22. Effet de l'extrait hexane aqueux de <i>T. vulgaris</i> sur le taux de croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	79
Figure 23. Effet de l'extrait hydroéthanolique de <i>T. vulgaris</i> sur le taux de croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	79
Figure 24. Effet de l'extrait hydrométhanolique de <i>T. vulgaris</i> sur le taux de croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	80
Figure 25. Effet de l'extrait aqueux de <i>T. vulgaris</i> sur le taux de croissance de <i>St.thermophilus</i> et <i>Lb.bulgaricus</i>	80
Figure 26. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis au développement de <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	85
Figure 27. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> vis-à-vis au développement de <i>Streptococcus thermophilus</i>	86
Figure 28. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait d'hexane-aqueux de <i>T. vulgaris</i>	94
Figure 29. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de <i>T. vulgaris</i>	94
Figure 30. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de <i>T. vulgaris</i>	95
Figure 31. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait	96

Liste des figures

hydraulique de <i>T.vulgaris</i>	
Figure 32. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait à l'hexane aqueux de <i>T.vulgaris</i>	98
Figure 33. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de <i>T.vulgaris</i>	99
Figure 34. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de <i>T.vulgaris</i>	100
Figure 35. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydraulique de <i>T.vulgaris</i>	101
Figure 36. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait à l'hexane aqueux de <i>T.vulgaris</i>	103
Figure 37. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de <i>T.vulgaris</i>	104
Figure 38. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de <i>T.vulgaris</i>	105
Figure 39. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydraulique de <i>T.vulgaris</i>	105
Figure 40. Variation du nombre de <i>St. thermophilus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait à l'hexane aqueux de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	107
Figure 41. Variation du nombre de <i>St. thermophilus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydroéthanolique de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	107
Figure 42. Variation du nombre de <i>St. thermophilus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydrométhanolique de <i>T. vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	108
Figure 43. Variation du nombre de <i>St. thermophilus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>T. vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	109
Figure 44. Variation du nombre de <i>Lb. bulgaricus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait à l'hexane aqueux de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	111
Figure 45. Variation du nombre de <i>Lb. bulgaricus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydroéthanolique de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	112
Figure 46. Variation du nombre de <i>Lb. bulgaricus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydrométhanolique de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	113
Figure 47. Variation du nombre de <i>Lb.bulgaricus</i> dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait aqueux de <i>T.vulgaris</i> durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.....	113

Résumé

L'étude avait pour objectif l'évaluation de l'effet des extraits phénoliques de *Thymus vulgaris* sur la croissance de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*, et l'impact de leur addition à faibles doses (2-8%) pour la fabrication d'un yaourt de type ferme concernant les variations des propriétés physicochimiques, microbiologiques et organoleptiques pendant 21 jours de stockage à 4°C. Les composants phénoliques ont été extraits des parties aériennes de la plante par macération à froid par usage de solvants à polarité croissante (hexane, éthanol, méthanol et eau) (solvant : eau, 80 :20 v/v). Le profil polyphénoliques de la plante a été déterminé par HPLC. La capacité de survie des cultures starter de yaourt en présence d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* a été évaluée par la détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et de la concentration minimale bactéricide (CMB). Le contenu phénolique total (CPT) était de 86.83 ± 1.11 ; 163.20 ± 0.57 ; 243.74 ± 0.61 et 126.47 ± 0.92 $\mu\text{g GAE /ml}$ d'extrait respectivement pour les extraits hexane-eau, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux. La quantité de composés flavonoïdes était de 05.12 ± 1.55 ; 37.83 ± 0.43 ; 42.21 ± 0.32 et 29.55 ± 0.68 $\mu\text{g EQ / ml}$ d'extrait respectivement pour les extraits hexane-eau, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux. Comme l'ont révélé les mesures quantitatives, le thymol et le carvacrol (54.39 ± 2.62 et 22.73 ± 1.03 en % CPT respectivement) sont apparues comme les principaux composés phénoliques des parties aériennes de l'extrait hexane-eau du thym. L'acide gallique et l'apigénine (24.92 ± 1.18 et 22.60 ± 1.07 en % CPT respectivement) pour l'extrait hydroéthanolique du thym. L'apigénine et la fisétine (40.46 ± 0.04 et 33.82 ± 0.02 en % CPT respectivement) pour l'extrait hydrométhanolique du thym. Tant dis que l'acide gallique et rosmarinique (52.15 ± 2.16 et 23.16 ± 1.02 en % CPT respectivement) étaient les composés phénoliques majeurs détecté dans l'extrait aqueux du thym. La CMI et la CMB contre la croissance des deux bactéries lactiques ont été obtenues à 60 % de concentration d'extraits phénoliques. Une modification significative ($p < 0,01$) du pH, de l'acidité titrable et de la viscosité apparente a été observée dans tous les yaourts expérimentaux. Les meilleurs scores d'évaluation sensorielle ont été enregistrés dans les échantillons ajoutés avec 2 % et 4 % d'extraits phénoliques du thym au même titre que le témoin. D'après les données recueillies, 2 % et 4 % d'extraits phénoliques du thym peuvent être incorporés dans le yaourt étuvé sans risque de détérioration de sa qualité physico-chimique et sensorielle ou l'inhibition des bactéries lactiques.

Mots-clés : *Thymus vulgaris*, extraits phénoliques, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, yaourt étuvé.

Abstract

The aim of this work was to evaluate the effect of *Thymus vulgaris* phenolic extracts on the growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*, and the impact of their addition in small amounts (2-8%) to a set-style yogurt with regard to variations in physicochemical, bacteria count and organoleptic properties during 21 days storage at 4°C. The phenolic components were extracted from the aerial parts of the plant by cold maceration using solvents of increasing polarity (hexane, ethanol, methanol and water) (solvent: water, 80 :20 v/v). The polyphenolic profile of the plant was determined by HPLC. The survival ability of yogurt starter cultures in the presence of *T. vulgaris* phenolic extracts was evaluated through the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The total phenolic content (TPC) was 86.83 ± 1.11 ; 163.20 ± 0.57 ; 243.74 ± 0.61 and 126.47 ± 0.92 µg GAE /ml of extract respectively for hexane-water, hydroethanolic, hydromethanolic and aqueous extracts. The number of flavonoid compounds was 05.12 ± 1.55 ; 37.83 ± 0.43 ; 42.21 ± 0.32 and 29.55 ± 0.68 µg EQ / ml of extract respectively for hexane-water, hydroethanolic, hydromethanolic and aqueous extracts. As the quantitative measurements revealed, thymol and carvacrol (54.39 ± 2.62 and 22.73 ± 1.03 in % of TPC respectively) appeared as the main phenolic compounds in the aerial parts of the hexane-water extract of thyme. Gallic acid and apigenin (24.92 ± 1.18 and 22.60 ± 1.07 in % of TPC respectively) for the hydroethanolic extract of thyme. Apigenin and fisetin (40.46 ± 0.04 and 33.82 ± 0.02 in % of TPC respectively) for the hydromethanolic extract of thyme. Both gallic and rosmarinic acid (52.15 ± 2.16 and 23.16 ± 1.02 in % of TPC respectively) were the major phenolic compounds detected in the aqueous extract of thyme. The MIC and MBC against the growth of both lactic bacteria were obtained at 60% of phenolic extracts concentration. A significant ($p < 0.01$) changes in pH, titrable acidity and apparent viscosity were observed in all experimental yogurts. The best scores of sensory evaluations were recorded in samples added with 2% and 4% of phenolic extracts as well as the control. Based on collected data, 2% and 4% of TVPE can be incorporated into yogurt without risk of deterioration in physicochemical quality or inhibition of lactic bacteria.

Keywords: *Lactobacillus bulgaricus*, Phenolic extracts, Set-style yogurt, *Thymus vulgaris*, *Streptococcus thermophilus*

Table des Matières

Remerciements

Dédicace

Valorisation des travaux

Liste des Abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Résumé

Introduction générale 01

Partie 1. Étude bibliographique

Chapitre I. Le yaourt : Profils microbiologiques et technologiques

1. Introduction.....	04
2. Fermentation et procédés	05
3. Le yaourt	06
4. Bactéries caractéristiques du yaourt.....	06
4.1. Cultures starter.....	06
4.2. Bactéries lactiques du yaourt	07
4.2.1. Le genre <i>Lactobacillus</i>	07
4.2.2. Le genre <i>Streptococcus</i>	09
5. Les probiotiques	10
5.1. Microorganismes probiotiques	10
5.2. Exemples de mélanges commerciaux de probiotiques.....	10
5.3. Laits et boissons fermentés probiotiques.....	10
6. Propriétés des yaourts	11
6.1. Types des yaourts	11
6.2. Cultures de yaourt.....	11
6.3. Fermentation lactique	12
6.4. Propriétés sensorielles	13
6.4.1. Saveur	13
6.4.2 Texture.....	14
7. Technologie du yaourt.....	14

7.1. Mélange.....	14
7.2. Traitement thermique.....	14
7.3. Homogénéisation	14
7.4. Ensemencement.....	15
7.5. Fermentation.....	15
7.6. Refroidissement	15
7.7. Conditionnement et stockage.....	15
7.8. Contrôle de la qualité.....	16
8. Enrichissement du yaourt.....	17
8.1. Consommation de yaourts et effets sur la santé.....	17
8.2. Enrichissement des produits laitiers	17
8.2.1. Fortification avec des probiotiques.....	17
8.2.2. Fortification en acides gras oméga-3.....	18
8.2.3. Fortification par des peptides bioactifs.....	18
8.2.4. Fortification avec des polyphénols	18
8.2.5. Enrichissement en vitamines.....	19

**Chapitre II. *Thymus vulgaris* : Composés bioactifs, Méthodes
d'extraction et Intérêt thérapeutique**

1. Introduction.....	20
2. Culture et distribution du <i>T. vulgaris</i>	20
3. Classification.....	21
4. Composition du de <i>T. vulgaris</i>	22
4.1. Huiles essentielles de <i>T. vulgaris</i>	22
4.2. Polyphénols et autre composé.....	23
5. Bioactivité de <i>T. vulgaris</i>	24
5.1. Activités anti-inflammatoires	24
5.2. Activités antimicrobiennes.....	24
5.2.1. Activité antibactérienne.....	24
5.2.2 .Activité antifongique.....	25
5.2.3. Activité antivirale.....	25
5.3. Activité antioxydante.....	25
6. Innocuité et toxicité de <i>Thymus vulgaris</i>	25
7. Principales utilisations dans l'industrie alimentaire.....	26

7.1. Plante fraîche et séchée.....	26
7.2. Extraits de thym et produits transformés.....	26
8. Extraction des composés bioactifs.....	27
8.1. Techniques d'extraction des composés actifs	28
8.1.1. Extraction par Soxhlet	28
8.1.2. Hydrodistillation.....	28
8.1.3 Macération.....	29
8.1.4 Extraction par agitation	29
8.2. Effet des paramètres d'extraction	30
8.2.1. Solvant d'extraction.....	30
8.2.2. pH.....	30
8.2.3. Température.....	31
8.2.4. Temps d'extraction.....	31
8.2.5 Rapport solvant / solide.....	32

**Chapitre III. Les polyphénols : Classification, Biodisponibilité,
Applications et Interactions**

1. Définition	33
2. Classification	33
2.1. Flavonoïdes.....	33
2.2. Acides phénoliques	34
2.3. Lignanes.....	35
2.4. Stilbènes.....	35
3. Biodisponibilité, absorption et métabolisme des polyphénols.....	35
3.1. Biodisponibilité.....	35
3.2. Absorption.....	36
3.3. Métabolisme	36
4. Polyphénols et santé	37
4.1. Effets antioxydants des polyphénols.....	37
4.2. Effets antimicrobiens des polyphénols.....	38
5. Application des polyphénols en industrie laitière.....	38
6. Interrelation entre les agents probiotiques et les polyphénols.....	39

Partie 2. Etude expérimentale

1. Objectifs	41
---------------------------	-----------

2. Intérêt de l'étude	43
3. Matériels	43
3.1. Matière végétal	44
3.2. Cultures starters de yaourt	44
3.3. Produits chimiques et appareillage	45
4. Méthodologie	45
4.1. Extraction des composés phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	45
4.2. Etude phytochimique de <i>T. vulgaris</i>	46
4.2.1. Alcaloïdes	46
4.2.2. Flavonoïdes	47
4.2.3. Détection d'anthocyanes	47
4.2.4. Détection des leucoanthocyanes	47
4.2.5. Tanins et autres composés phénoliques	47
4.2.6. Coumarines	48
4.2.7. Triterpènes et stéroïdes	48
4.2.8. Quinones	49
4.2.9. Saponines	49
4.2.10. Composés cyanogénétiques	50
4.3. Détermination des Composés phénoliques Totaux (CPT)	50
4.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes	50
4.5. Profil chromatographique des extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	51
4.6. Etude des effets antimicrobiens des extraits de thym	51
4.6.1 Activation des inocula microbiens	51
4.6.2 Méthode de contact direct	52
4.6.3 Méthode des disques par diffusion sur gélose	53
4.6.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)	54
4.6.5 Concentration minimale bactéricide (CMB)	55
4.7. Production et évaluation de la qualité d'un yaourt étuvé enrichi d'extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i>	56
4.7.1. Préparation des levains lactiques	56
4.7.2. Production des yaourts étuvés enrichis en extraits phénoliques de <i>T. vulgaris</i> .	57
4.7.3. Détermination des paramètres physicochimiques des yaourts expérimentaux.	57
4.7.3.1. Acidité titrable	57

4.7.3.2. pH	58
4.7.3.3. Viscosité	58
4.7.4. Dénombrement des cultures starter de yaourt	60
4.7.5. Test organoleptique	60
5. Traitement statistique	60

Partie 3. Résultats et discussion

Chapitre I

Caractérisation des principaux composés phénoliques de <i>Thymus vulgaris</i>	61
1. Résultats	61
1.1. Teneur en eau	61
1.2 Caractérisation phytochimique.....	61
1.3. Composés phénoliques totaux (CPT) et flavonoïdes des extraits de <i>T. vulgaris</i> ..	62
1.4. Profil en polyphénols des extraits de <i>T. vulgaris</i>	62
2. Discussion.....	65
Conclusion partielle.....	70

Chapitre II

Effets inhibiteurs des extraits phénoliques de <i>Thymus vulgaris</i> chez <i>Streptococcus thermophilus</i> et <i>Lactobacillus bulgaricus</i>	71
1. Résultats.....	71
1.1. Diamètres d'inhibitions.....	71
1.2. Taux d'inhibition.....	75
1.3. Méthode de contact direct.....	77
1.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI).....	81
1.5. Concentration minimale bactéricide (CMB).....	83
2. Discussion	87
Conclusion partielle.....	91

Chapitre III

Evaluation de la qualité d'un yaourt type " ferme " enrichi en extraits phénoliques de <i>Thymus vulgaris</i>	92
1. Résultats	92
1.1. Qualité physicochimique des yaourts étuvés enrichi en composés phénoliques...	92
1.1.1. pH.....	92
1.1.2. Acidité.....	96
1.1.3. Viscosité apparente	101

1.2. Qualité microbiologique des yaourts étuvés enrichis en composés phénoliques	106
1.2.1. <i>St. thermophilus</i>	106
1.2.2. <i>Lb. bulgaricus</i>	110
1.3. Qualité organoleptique des yaourts étuvés enrichi en composés phénoliques....	115
1.3.1. Goût acide.....	115
1.3.2. Goût de fraîcheur.....	116
1.3.3. Cohésivité.....	118
1.3.4. Adhésivité.....	119
1.3.5. Odeur	121
1.3.6. L'arrière-goût.....	121
1.3.7. La couleur	123
2. Discussion	125
2.1. Qualité physicochimique des yaourts	125
2.2. Cultures starters de yaourt.....	129
2.3. Qualité sensorielle des yaourts expérimentaux	132
Conclusion partielle	134
Conclusion générale	136
Références bibliographiques	
Annexes	

Introduction Générale

Introduction générale

La tendance actuelle des consommateurs à s'alimenter d'une manière saine et équilibrée en associant les bienfaits antioxydants des composés secondaires naturels des plantes médicinales ont contribué à la mise en avant sur le marché mondial de nouveaux aliments santé (Tavakoli et al., 2017). C'est ainsi que des aliments fonctionnels à base de polyphénols (PPs) naturels dont l'apport recommandé est de 1 g/jour (Georgé et al., 2005) ont vu le jour et font actuellement partie intégrante de notre alimentation (Vieira da Silva et al., 2016 ; Granato et al., 2017). L'idée d'utiliser ces composés bioactifs dans les aliments populaires à large consommation a constitué, par ailleurs, une approche pratique et viable pour augmenter leur consommation quotidienne.

Les PPs sont des micronutriments phytoactifs synthétisés par les plantes et font partie de leurs métabolites secondaires, qui, dans la plupart des cas, sont utilisés dans les mécanismes de défense pour contrer les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Perna et al., 2014 ; GutiErrez-Grijalva et al., 2016). La grande capacité antioxydante de ces composés exerce, également, des effets positifs sur la santé humaine en permettant de lutter efficacement surtout contre certaines pathologies du siècle tels que le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires (Sun-Waterhouse et al., 2013 ; Perna et al., 2014).

Il est bien prouvé que la biotransformation de ces biomolécules (PPs) actives n'est rendue possible au niveau de l'écosystème intestinal que par certaines souches, telles que les bactéries lactiques (LAB) (Krumbeck et al., 2016 ; Westfall et al., 2018). Les LAB ont la capacité de se multiplier dans des milieux contenant des PPs et de les convertir, en particulier par fermentation, en métabolites simplifiés biodisponibles tels que les acides phénoliques (acide férulique, acide p-coumarique, etc.) qui peuvent être absorbés dans le système circulatoire (Hervert-Hernández et al., 2009 ; Tabasco et al., 2011). En outre, les PPs ont été récemment décrites comme ayant des propriétés prébiotiques capables de favoriser la croissance des bactéries probiotiques tout en augmentant leur capacité d'adhésion dans le tube digestif (Valdes et al., 2015 ; Celebioglu et al., 2018).

Le *Thymus vulgaris*, plante annuelle de la famille des Lamiacées (Li et al., 2011) revêt des avantages importants pour la santé, démontrés surtout par les effets bénéfiques (anti-inflammatoires, antimicrobiens, anticancérogènes, antiviraux et antiallergiques) caractérisant

Introduction générale

leurs principaux composés bioactifs constitutifs (**Mahmoodi et al., 2019**). En raison de leurs teneurs élevées en PPs à fort pouvoir antioxydant l'usage des extraits naturels de thym dans certains produits alimentaires transformés peut sans doute constituer une alternative intéressante à l'usage abusifs et non autorisé d'additifs synthétiques comme les sorbates de potassium ayant montré des effets néfastes pour la santé et peut même contribuer à l'élaboration de nouveaux aliments alicaments capables de satisfaire la demande sans cesse croissante des consommateurs.

Des applications innovantes basées sur les caractéristiques fonctionnelles et biologiques des PPs ont été introduites dans la fabrication des aliments (**Hunaefi et al., 2013 ; Martins et al., 2014**). La combinaison de PPs provenant de plantes médicinales avec les bactéries de l'acide lactique représente un bon exemple à étudier. Ce type d'interaction est particulièrement renforcé lorsque les PPs et les LAB coexistent dans le tractus gastro-intestinal ou dans les produits alimentaires (**Duda-Chodak et al., 2008**).

Le yaourt est un produit laitier fermenté produit par deux cultures starter lactiques spécifiques dont *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* (**Guarner et al, 2005 ; Sanders et al., 2010 ; Kok et Hutkins, 2018**). Véritable vecteur de souches probiotiques il contient toutefois de faibles teneurs en PPs (**O'Connell et Fox, 2001 ; Farnworth et al., 2007 ; Rezac et al., 2018**). En raison de sa large consommation de part le monde (environ 230801 tonnes/an) (**Narvhus et Abrahamsen, 2021**), le yaourt peut, sans doute, constituer une matrice alimentaire tant soit peu originale pour la conception de nouveaux produits diététiques pouvant allier les bienfaits santé des cultures starter et des PPs contenus dans certaines plantes médicinales dont ceux provenant de la plante objet de l'étude à savoir le *T. vulgaris*.

D'une façon générale, les objectifs escomptés à travers cette étude s'articulent autour de trois points essentiels :

- Identification des composés phénoliques présents dans le *T. vulgaris*
- Evaluation de l'effet des extraits phénoliques de *T. vulgaris* sur la croissance et la viabilité de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*.

Introduction générale

- Détermination de l'impact d'ajout des extraits phénoliques de *T. vulgaris* (2-8% v/v) au yaourt sur les propriétés physicochimiques, microbiologiques et sensorielles du produit pendant 21 jours de stockage à 4°C.

Ce manuscrit est subdivisé en trois parties :

- La première partie a été consacrée à la synthèse bibliographique comportant trois chapitres ; le premier chapitre décrit les profils microbiologiques et technologiques du yaourt, le second chapitre porte sur le thym ; sur sa composition, ses propriétés, ses indications thérapeutiques ainsi que ses applications dans le domaine alimentaire ; le troisième chapitre est un aperçu sur les polyphénols : Classification, Biodisponibilité, Applications et Interactions.
- La deuxième partie concerne la méthodologie expérimentale adoptée pour étudier l'effet des extraits phénoliques de thym sur la viabilité et la croissance des cultures starter du yaourt ainsi l'impact de leur ajout a faibles doses sur la qualité du produit fini ;
- La troisième partie a porté sur la critique et la discussion des résultats obtenus et les perspectives de recherches développement à entreprendre dans un avenir proche.

Partie 1

Etude bibliographique

Chapitre I

Le yaourt : Profils microbiologiques et technologiques

1. Introduction

D'un point de vue historique, la conservation de plusieurs produits alimentaires peut être obtenue avec une amélioration remarquable de la qualité "perçue" lorsque des procédés fermentaires sont utilisés (**Leroy et De Vuyst, 2004**). En fait, la composition chimique des matières premières d'origine, également appelées "ingrédients alimentaires", est cruciale. Dans le même temps, les processus de fermentation doivent être utilisés pour améliorer les profils microbiologiques des aliments conservés en fonction des demandes de marketing, des besoins des consommateurs et des questions réglementaires. En tous les cas, le problème de la sécurité alimentaire est la principale exigence (**Motarjemi, 2002**). Par conséquent, la fermentation est l'une des principales techniques de conservation des denrées alimentaires, mais la gestion de nombreuses variables est nécessaire lorsqu'on parle de produits fermentés.

En général, les aliments fermentés sont subdivisés en fonction de l'origine des principaux ingrédients comme suit : (**Tamime et Robinson, 1999**).

- Lait fermentés, yaourt, kéfir, fromages . . . etc.
- Boissons alcoolisées.
- Viandes fermentées.
- Les ensilages fermentés tels que les ensilages d'herbe et de poisson.

Il convient de considérer qu'une grande partie des microorganismes "indigènes" ou "sauvages" - souvent de simples microflore contaminantes - peuvent être utilisés à des fins fermentaires avec des résultats acceptables. En outre, un certain effet positif pourrait être obtenu de cette manière contre les bactéries pathogènes dans les aliments particuliers (**Zhang et al., 2011**). Pour ces raisons, l'industrie des procédés fermentaires a encouragé la création et l'utilisation de cultures starter fiables : la capacité de fournir des résultats sûrs et prévisibles avec une variété élargie d'ingrédients alimentaires est la clé du succès de la culture starter. (**Leroy et al., 2006**). L'un des processus fermentaires connus et historiques concerne la conservation efficace des laits (**Prajapati et Nair, 2003**).

En fait, le terme moderne " yaourt " ou " yoghurt " est une corruption du nom turc original : yoghurt (**Prajapati et Nair, 2003**). Actuellement, la consommation des laits fermentés est très courante dans de nombreuses populations. Deux typologies différentes de yaourts peuvent être grossièrement distinguées :

-Laits acides tels que le yaourt et le Kajmac (**Jokovic et al., 2008**).

- Laits acides-alcooliques tels que le kéfir et le koumiss russe et mongol (**Liu et al., 2011**).

2. Fermentation et procédés

D'une manière générale, le terme "fermentation" désigne la transformation catalytique de substances organiques, principalement des glucides, par des enzymes d'origine microbienne (**Cappelli et Vannucchi, 1990**). Ces modifications peuvent représenter une certaine altération indésirable ; d'autre part, l'action des enzymes microbiennes par des micro-organismes sélectionnés peut être utilisée pour la production sûre et pratique de produits alimentaires.

Les procédés industriels de fermentation pour les applications alimentaires peuvent être subdivisés en deux catégories :

(1) Les procédés homofermentaires : on obtient la production d'un seul composé. Par exemple : fermentation lactique ; produit obtenu : acide lactique.

(2) Les procédés hétérofermentaires : deux ou plusieurs produits finaux sont obtenus comme l'acétone-butanol-éthanol (**Park et al., 1989**).

La fermentation homolactique est réalisée principalement par les bactéries acidogènes *Lactobacillus* et *Streptococcus*, correspond à la transformation microbiologique du lactose en acide lactique par réduction de l'acide pyruvique. En raison de la grande efficacité du processus fermentaire, la stratégie homolactique est utile pour la préparation des yaourts, l'affinage des fromages et la conservation de plusieurs produits. (**Fleming et al., 1985**).

Actuellement, les produits laitiers fermentés peuvent correspondre à une grande variété de typologies différentes, en fonction du résultat des conditions environnementales, des microorganismes utilisés et des processus de production. Le point commun est la mise en évidence d'une fermentation lactique intense due au développement des bactéries lactique dans les laits. Il se peut que l'association des bactéries lactiques avec d'autres formes de vie co-fermentaires - levures, bactéries acétiques et moisissures - soit observable avec des résultats différents. Cependant, les laits fermentés devraient maintenir une qualité constante et acceptable lorsque les processus fermentaires sont préconçus dans le but de produire un petit nombre de produits finaux, principalement de l'acide lactique (**Corradini, 1995**).

D'un point de vue général, le lait fermenté est un produit obtenu par coagulation du lait sans soustraction de sérum (Corradini, 1995). L'action des microorganismes fermentaires est requise et doit exclure d'autres processus de coagulation ou de gélification. De toute façon, les bactéries lactiques doivent rester vivantes jusqu'au moment de la consommation.

3. Le yaourt

Le yaourt, également appelé "yoghourt", est un produit fabriqué à partir de lait traité par la chaleur. Il faut considérer que la " matière première " originale peut être homogénéisée avant l'ajout de cultures starter contenant *Lactobacillus bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* (Chandan et Kilara, 2013). De même, le yaourt peut être défini comme le produit de la fermentation lactique des laits par l'ajout d'une culture starter, avec la diminution conséquente du pH à 4,6 ou à des valeurs inférieures (Tamime, 2002).

4. Bactéries caractéristiques du yaourt

4.1. Cultures starter

La production d'aliments fermentés est aujourd'hui basée sur l'utilisation de cultures starter, par exemple des bactéries de l'acide lactique (LAB), qui initient une acidification rapide de la matière première (Bintsis, 2018). Le grand avantage des cultures starter est qu'elles peuvent assurer une fermentation contrôlée et prévisible. Les cultures starter peuvent contribuer à la sécurité microbienne ou offrir un ou plusieurs avantages technologiques, organoleptiques, nutritionnels et sanitaires. Citons par exemple les LAB qui produisent des substances antimicrobiennes, des polymères de sucre, des édulcorants, des composés aromatiques, des vitamines ou des enzymes utiles (Leroy et De Vuyst, 2004).

L'utilisation de ces cultures pour la préparation des produits laitiers est pratiquée depuis des temps immémoriaux. Traditionnellement, la méthode courante consistait à utiliser le produit du jour précédent (lait, lactosérum, babeurre, etc.) comme inoculum pour produire de nouveau produit fermenté. Ces méthodes n'étaient pas fiables et entraînaient souvent des défauts de goût et des défaillances dues à une fermentation indésirable. (Bylund, 1995).

Les ferments lactiques peuvent être définis comme le groupe de micro-organismes soigneusement sélectionnés qui sont délibérément ajoutés au lait et aux produits laitiers pour apporter des changements fermentaires souhaitables. Ceux-ci ont un rôle multifonctionnel dans la fermentation laitière ; le principal est de produire de l'acide lactique, d'où le nom populaire de bactéries lactiques (LAB) (Yang et al., 2014).

Outre la production d'acide lactique, certaines cultures remplissent des fonctions secondaires telles que la production d'acide acétique, propionique et folique, de CO₂, de H₂O₂, d'éthanol, de bactériocines, d'exopolysaccharides (EPS), ...etc.(**Padalino et al., 2012**).

4.2. Bactéries lactiques du yaourt

Les bactéries lactiques (LAB) sont un groupe de cocci ou de bâtonnets à Gram positif, non sporulant, anaérobies ou aérobies facultatifs, qui produisent de l'acide lactique comme l'un des principaux produits de fermentation. Elles sont chimio-organotrophes et ne se développent que dans des milieux complexes (**Hayek et Ibrahim, 2013**). Les hydrates de carbone fermentescibles sont utilisés comme source d'énergie. Les hexoses sont principalement dégradés en lactate (homofermentaire) ou en lactate et produits supplémentaires tels que l'acétate, l'éthanol, le CO₂, le formiate ou le succinate (hétérofermentaire). Les bactéries lactiques sont présentes dans les aliments (produits laitiers, viande fermentée, pâte aigre, légumes fermentés, ensilage, boissons), sur les plantes, dans les eaux usées, mais aussi dans les voies génitales, intestinales et respiratoires de l'homme et des animaux (**Hammes et al., 1991**).

Bien que de nombreux genres de bactéries produisent de l'acide lactique comme produit final primaire ou secondaire de la fermentation, le terme de bactéries lactiques est traditionnellement réservé aux genres de *Lactobacillales*, qui comprennent les *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*, en plus des *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* et *Weisella* (**Monnet et al., 2003**).

Les bactéries spécifiques du yaourt appartiennent à deux genres microbiens :

4.2.1. Le Genre *Lactobacillus*

Les lactobacilles sont des bâtonnets ou coccobacilles à Gram positif, non sporulés, dont la teneur en G+C de l'ADN est généralement inférieure à 50 % en moles. Ils sont strictement fermentatifs, aérotolérants ou anaérobies, acidophiles et ont des besoins nutritionnels complexes. Avec le glucose comme source de carbone, les lactobacilles peuvent être soit homofermentaires, produisant plus de 85% d'acide lactique, soit hétérofermentaire, produisant de l'acide lactique, du CO₂, de l'éthanol (et/ou de l'acide acétique) en quantités équimolaires (**Hammes et Vogel, 1995**).

Les espèces du genre *Lactobacillus* font partie des taxons les plus importants impliqués dans la microbiologie alimentaire et la nutrition humaine : plusieurs espèces de

Lactobacillus sont remarquablement essentielles dans la production d'aliments fermentés et sont utilisées comme cultures starter ou comme conservateurs alimentaires. En outre, certaines souches d'origine humaine sont exploitées comme probiotiques ou vecteurs de vaccins (Goh et Klaenhammer, 2009).

Ce genre comprend un grand nombre d'espèces GRAS (Generally Recognized As Safe) parmi les bactéries de l'acide lactique (LAB), un groupe fonctionnel comprenant des bactéries à Gram positif et à catalase négative qui produisent de l'acide lactique comme principal produit de la fermentation des glucides (Klaenhammer et de Vos, 2011).

Lactobacillus bulgaricus

Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus (appelée *Lactobacillus bulgaricus*) est l'une des trois sous-espèces de *L. delbrueckii*. C'est une bactérie homofermentaire aéro-anaérobie facultative (c'est-à-dire qu'elle convertit l'hexose en acide lactique par la voie Emden-Meyerhof) isolée du yaourt et du fromage. Les glucides fermentés par *Lb. bulgaricus* sont le fructose, le glucose et le lactose. L'acide lactique est le principal produit de la fermentation ; cependant, des produits secondaires, tels que l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acétoïne et le diacétyl, peuvent également être produits à très faible concentration (Teixeira, 2014).

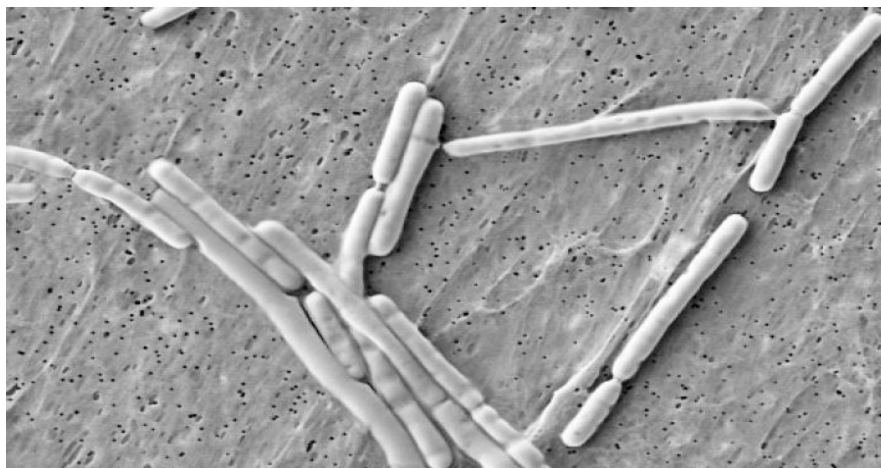


Figure 1. Cellules de *Lactobacillus bulgaricus* observées par microscopie électronique à balayage (Chandan et Kilara, 2013).

4.2.2. Le Genre *Streptococcus*

Le genre *Streptococcus* est constitué de cellules Gram-positives, sphériques ou ovoïdes qui sont généralement disposées en chaînes ou en paires. Ces cocci sont facultativement anaérobies, non sporulés, catalase-négatifs, homofermentaires et ont des besoins nutritionnels complexes. Bon nombre des espèces connues sont parasites chez l'homme ou d'autres animaux et certaines sont des agents pathogènes importants (Colman, 1990).

Streptococcus thermophilus

Streptococcus thermophilus est une bactérie lactique à Gram positif, non pathogène et anaérobie facultative (LAB). Cette bactérie est apparentée à d'autres bactéries lactiques, telles que *Lactococcus lactis*, qui est largement utilisée en industrie laitière (Del Rio, 2014). Parmi les bactéries pathogènes opportunistes utilisées pour la préparation des produits laitiers, *St. thermophilus* est la seule espèce généralement reconnue comme étant sûre. Cette espèce peut être utilisée seule ou en combinaison avec d'autres LAB pour la fabrication des produits laitiers tels que le fromage et le yaourt (Li et al., 2017).

St. thermophilus a la capacité de métaboliser le lactose en exopolysaccharides, vitamines et plusieurs composés aromatiques (Leroy & De Vuyst, 2004). Dans les produits laitiers, plusieurs catégories de composés aromatiques organiques volatils ont été identifiées, notamment les acides carboxyliques, les aldéhydes, les cétones, les alcools et les esters. Ces composés volatils donnent la texture et la saveur des produits laitiers et sont donc les principaux facteurs déterminants la qualité des produits (Hols et al., 2005).

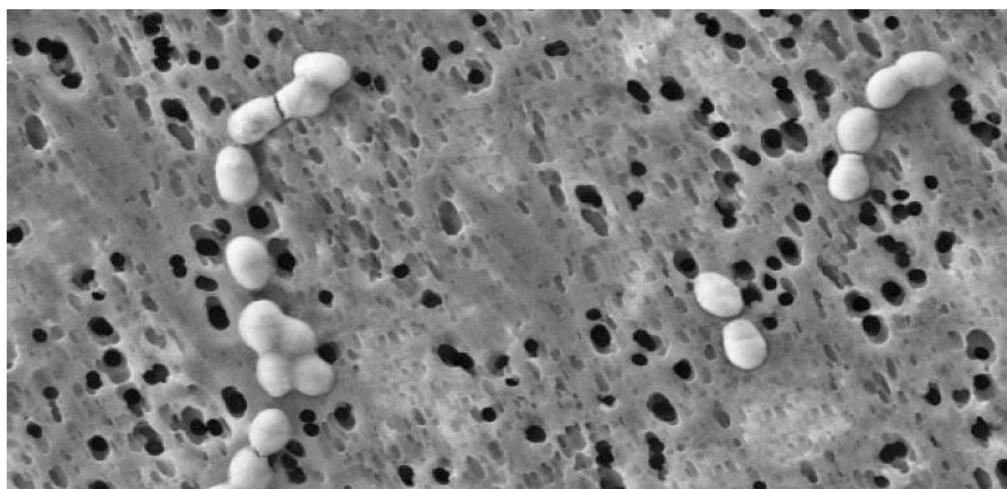


Figure 2. Cellules de *Streptococcus thermophilus* observées par microscopie électronique à balayage (Chandan et Kilara, 2013).

5. Les probiotiques

5.1. Microorganismes probiotiques

Les bactéries lactiques (LAB) utilisées lors de la fabrication des laits fermentés et de fromages et qui appartiennent aux genres *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Propionibacterium* sont souvent considérées comme des souches probiotiques. Par ailleurs, *Saccharomyces cerevisiae var. boulardii* est la seule levure identifiée comme étant probiotique et les données disponibles concernant son utilisation dans les produits laitiers sont très limitées (Urkek et al., 2014 ; Gil-Rodriguez et al., 2015).

5.2. Exemples de mélanges commerciaux de probiotiques

Les bactéries probiotiques actuellement utilisées dans les produits commerciaux appartiennent principalement aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium*. D'autres espèces qui ont été identifiées comme probiotiques comprennent *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus spp* et la levure *Sac. cerevisiae var. boulardii*. L'utilisation de certaines de ces espèces microbiennes dans les produits laitiers a été rapportée par de nombreux chercheurs (Franz et al., 2011 ; Kongo et Malcata, 2016).

Le schéma global de consommation de tous les types de laits fermentés augmente régulièrement dans la majorité des pays du monde, ce qui peut être attribué aux aspects nutritionnels et sanitaires associés à ces produits (IDF, 2015).

5.3. Laits et boissons fermentés probiotiques

Une large gamme de produits laitiers fermentés est fabriquée dans de nombreux pays. L'exemple classique est le yaourt, qui est fabriqué sous forme de yaourts prêts à l'emploi, brassés et/ou à boire, et ces produits peuvent être aromatisés en ajoutant des préparations à base de fruits ou d'essences de fruits ainsi que des matières colorantes. Différents laits de mammifères ont été utilisés pour la fabrication de laits fermentés, y compris les boissons (Hussein et al., 2013).

Le yaourt est fabriqué à partir de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* comme cultures starter. Selon les concepts scientifiques actuels, les cultures de yaourt sont des probiotiques. Toutes les souches de *St. thermophilus* et la plupart des souches de *Lb. bulgaricus* ont une activité lactase élevée. (Sanders et al., 1996).

6. Propriétés des yaourts

6.1. Types des yaourts

Jusqu'à une date plus récente, la perception de la teneur en matières grasses du yaourt était importante. Ce n'est qu'au cours des dernières décennies que le yaourt a été fabriqué principalement avec du lait entier, à moins qu'il ne soit clairement étiqueté, c'est-à-dire fait avec du lait écrémé ou sans gras (Aryana & Olson, 2017). Dans les années 1980 et 1990, les régimes à faible teneur en matières grasses ont fait fureur chez les fabricants pour améliorer la saveur et la texture des aliments à faible teneur en matières grasses. Au cours de cette période, un certain nombre d'entreprises ont commencé à produire et à breveter leur yaourt aux fruits à faible teneur en gras et en calories (Baker, 1983).

Les types les plus courants des yaourts actuellement sur le marché sont le yaourt étuvé, brassé et le yaourt à boire (Gharibzahedi & Chronakis, 2018). Le yaourt contenant des fruits, des arômes ou tout autre ingrédient exige un brassage avant d'être consommé pour assurer une incorporation adéquate des ingrédients. Les yaourts étuvés sont inoculés avec les ferments lactiques, placés directement dans le récipient, puis laissés fermenter (Hutkins, 2006).

6.2. Cultures de yaourt

La sélection d'une bactérie lactique comme ferment pour la production du yaourt a une influence énorme sur la saveur, la texture, l'apparence et les attributs généraux du produit fini (Hutkins, 2006). *Lb.bulgaricus* et *St.thermophilus* sont les principales souches utilisées pour la production de yaourt. Ces bactéries sont généralement inoculées avec un rapport de 1:1 suivant leur relation symbiotique (Aryana et Olson, 2017 ; Hutkins, 2006). Si le yaourt est fait uniquement avec *St. thermophilus* ou *Lb. bulgaricus*, il ne donnera pas de bons résultats. Les recherches montrent qu'ils poussent plus vite et sont plus performants lorsqu'ils sont utilisés ensemble (figure 3). *St.thermophilus* commence à se développer en premier en abaissant le pH du lait à des niveaux préférés pour *Lb. bulgaricus*. *St. thermophilus* est faiblement protéolytique et incapable d'hydrolyser la caséine. *S. thermophilus* doit utiliser les acides aminés libres présents dans le lait avant que *Lb. bulgaricus* puisse produire la protéinase nécessaire à la dégradation des protéines présentes dans le lait (Hutkins, 2006).

A un moment donné, *Lb. bulgaricus* produit plus d'acide que *St. thermophilus* ne peut tolérer, ce qui entraîne une légère diminution de la population de *St. thermophilus*, ce qui fait que *S. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* sont propagés séparément. Les cultures sont souvent mélangées avec des proportions convenables. Selon la souche choisie et les instructions de fabrication, les cultures sont ajoutées à une concentration de 10^7 cellules par gramme. Cette concentration équivaldrait à environ 1,5 à 2 % d'inoculum sur la base du poids (Hutkins, 2006).

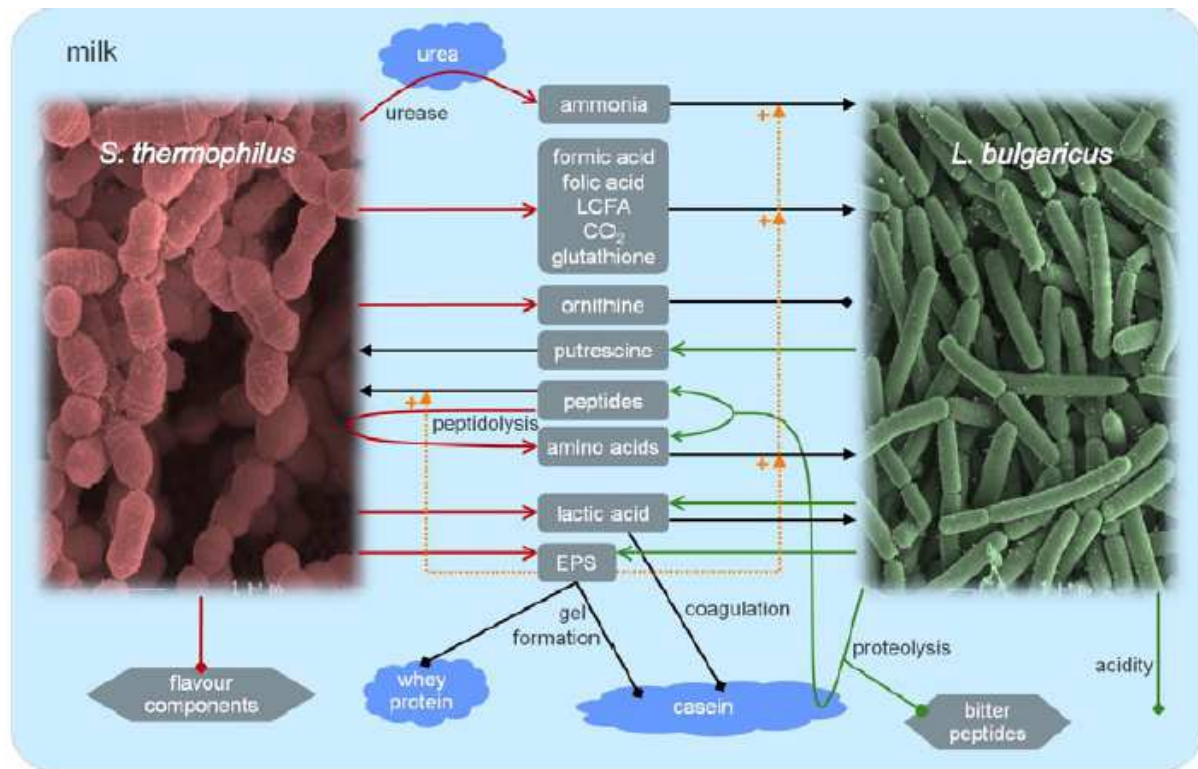


Figure 3. Représentation schématique des interactions entre *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* pendant la fermentation du yaourt (Sieuwerds, 2016).

6.3. Fermentation lactique

Le processus de fermentation est un processus chimique dans lequel les enzymes décomposent des substances organiques plus grandes en composés plus petits. Le résultat de ce processus permet à certains nutriments d'être plus disponibles sur le plan nutritionnel, prolongeant ainsi la durée de conservation de certains aliments et rehaussant la saveur du produit. Les levures, les moisissures et les bactéries peuvent toutes effectuer le processus de fermentation (Gahruie et al., 2015). *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* sont des

homofermentaires, produisant de l'acide lactique comme principal produit final à partir du métabolisme et de la fermentation du lactose (**Hutkins, 2006**).

Dans la fabrication du yaourt, le pH est abaissé par le processus de fermentation des bactéries lactiques qui transforment le lactose en acide lactique (**Tamin et Robinson, 1999**). L'acidification est responsable de la coagulation et de la formation du gel dans le lait. La caséine commence à se déstabiliser à un pH de 5,3 à 5,2 et la formation du caillé lactique est observé à un pH de 4,7 à 4,6 (**Sert, Mercan et Dertli, 2017**).

6.4. Propriétés sensorielles des yaourts

La formation d'arômes dans les produits laitiers, en particulier le yaourt, est le résultat d'un processus complexe. Les trois principaux processus qui contribuent au développement des arômes sont : la glycolyse, la lipolyse et la protéolyse. Les principales caractéristiques qualitatives du yaourt sont le goût, la texture, l'arôme et la saveur (**Cheng, 2010 ; Pourahmad et Assadi, 2005**).

6.4.1. Saveur

La saveur est l'un des composants les plus importants de tout produit alimentaire ou boisson. Les gens baseront leur acceptabilité ou leur préférence d'un produit uniquement sur la saveur (**Cheng, 2010**). Les propriétés sensorielles des produits laitiers dépendent en grande partie de l'équilibre des arômes dérivés des protéines, des glucides et des lipides présents dans le lait. La saveur unique du yaourt provient de l'acide lactique et d'un certain nombre de composés aromatiques naturellement présents dans le lait ainsi que ceux produits par le processus de fermentation (**Imhof et O, 1994 ; Ott et al., 1997**). Plus de 90 composés volatils et semi-volatils ont été identifiés dans le yaourt, ils proviennent de différents groupes chimiques comme les alcools, les aldéhydes, les cétones, les acides, les esters, les composés contenant du soufre, les pyrazines et les dérivés du furanne (**Marshall, 1993 ; Ott et al., 1997**).

Bien que l'équipement d'analyse actuel ait la capacité de détecter un certain nombre de composés volatils, seuls quelques-uns d'entre eux sont présents à des concentrations suffisamment élevées pour jouer un rôle vital dans le profil sensoriel du yaourt. L'acétaldéhyde, l'éthanol, l'acétone, le diacétyle et la butanone jouent un rôle important dans les composés aromatiques recherchés contenus dans le yaourt (**Tamin et Robinson, 1999**).

6.4.2 Texture

La texture et les propriétés rhéologiques jouent un rôle tout aussi important que les composés aromatiques et gustatifs. La sensation en bouche caractéristique du yaourt provient de la coagulation du lait qui forme un gel protéiné. La formation et l'entretien du gel protéique sont extrêmement importants pour la qualité du yaourt. Les propriétés du gel peuvent être influencées par un certain nombre de facteurs tels que les ingrédients du mélange de yaourt, la transformation et la fabrication du yaourt, l'activité des cultures lactiques et les températures post-fermentation. Un traitement thermique approprié du lait peut avoir une influence profonde sur la force du gel et la capacité de rétention d'eau du yaourt (**Hutkins, 2006**).

7. Technologie du yaourt

En général, les étapes suivantes sont nécessaires dans la fabrication de yaourt (**figure 4**) (**Chandan, 2014**).

7.1. Mélange

Les ingrédients liquides sont mesurés dans des cuves de transformation, puis des ingrédients solides (lait en poudre, MGLA...) sont ajoutés. Il est nécessaire de disperser et de dissoudre de manière homogène les ingrédients secs dans la phase liquide en utilisant des mélangeurs mécaniques (triblender). La matière première utilisée doit être de bonne qualité microbiologique, exempte d'antibiotiques ou autres inhibiteurs.

7.2. Traitement thermique

En général, la pasteurisation du lait est effectuée dans le but de tuer tous les micro-organismes pathogènes, de réduire considérablement la majorité des autres organismes présents et d'inactiver les enzymes inhérentes au lait. Le traitement thermique dénature les protéines du lactosérum et engendre des conditions optimales pour la croissance des cultures de yaourt. La dénaturation poussée des protéines du lactosérum (80 à 85 %) augmente leur capacité de liaison à l'eau, ce qui améliore la consistance et la viscosité du yaourt et contribue à empêcher la séparation libre du lactosérum (synérèse).

7.3. Homogénéisation

Ce processus de rupture mécanique des globules gras en plus petites tailles permet une dispersion plus uniforme des stabilisateurs dans le mélange de yaourt. Il empêche également la montée de la couche de crème dans les récipients et les pots de yaourt. Dans la fabrication de yaourt "naturel" avec une stabilisation minimale (solides-non gras 11% à 13 %), une

pression d'homogénéisation élevée d'environ 28 MPa est utilisée pour améliorer la consistance et aider à prévenir la séparation du lactosérum.

7.4. Ensemencement

Le mélange de yaourt est porté à une température égale à 42°C dans un échangeur de chaleur à plaques puis pompé vers les cuves de fermentation. Le mélange est ensuite inoculé avec 2 % de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* (v/v). Pendant la fermentation du yaourt, l'acide lactique est produit en raison de la croissance bactérienne. En même temps, un goût typique de yaourt est généré et le mélange acquiert une consistance coagulée et épaisse.

7.5. Fermentation

Les cuves de fermentation pour la production de yaourt sont généralement conçues avec un fond conique pour faciliter l'écoulement des fluides relativement visqueux après incubation. Le starter est généralement inoculé à un niveau de 3%. Pour maintenir la température à environ 43°C pendant la période d'incubation (4heures), la cuve de fermentation est généralement isolée et recouverte d'une surface extérieure en acier inoxydable.

7.6. Refroidissement

L'objectif du refroidissement est de limiter la croissance des ferments et de maintenir le pH à une valeur souhaitable. La valeur du pH doit être comprise entre 4,5-4,6. La vitesse de refroidissement doit être régulière mais pas trop rapide. Un refroidissement trop rapide peut entraîner des changements défavorables dans la structure du coagulum, ce qui contribue à la séparation du lactosérum dans le yaourt fini. La méthode de refroidissement dépend du style de yaourt qui est produit. Il est souhaitable d'atteindre une température de 18-20°C en 1 h pour arrêter rapidement la croissance des levains lactiques.

7.7. Conditionnement et stockage

Le yaourt est généralement conditionné dans des récipients en plastique dont le poids varie de 100 à 900 g. Les machines utilisent un remplissage volumétrique à piston. Le pot peut être formé dans l'usine par moulage, un procédé dans lequel des billes de plastique sont injectées dans un moule à haute température et à pression élevées. Dans ce type d'emballage, un couvercle en aluminium découpé est thermoscellé sur les pots. Ils sont ensuite placés dans des caisses et transférés dans une salle réfrigérée pour le refroidissement. Préparés selon une technologie rigoureuse et dans des conditions hygiéniques strictes, le yaourt peut se conserver

environ 3 semaines jusqu'à la vente au consommateur sous réserve d'être maintenu au froid (entre 4 et 8°C).

7.8. Contrôle de la qualité

Le contrôle de la qualité comprend le contrôle de la composition, de la viscosité, de la couleur, de la saveur et de la texture du produit, ainsi que le processus de fermentation. Les tests quotidiens de la composition chimique sont le pH et la qualité sensorielle. Les normes de produit concernant la matière grasse, les solides, la viscosité et l'acidité titrable doivent être strictement respectées.

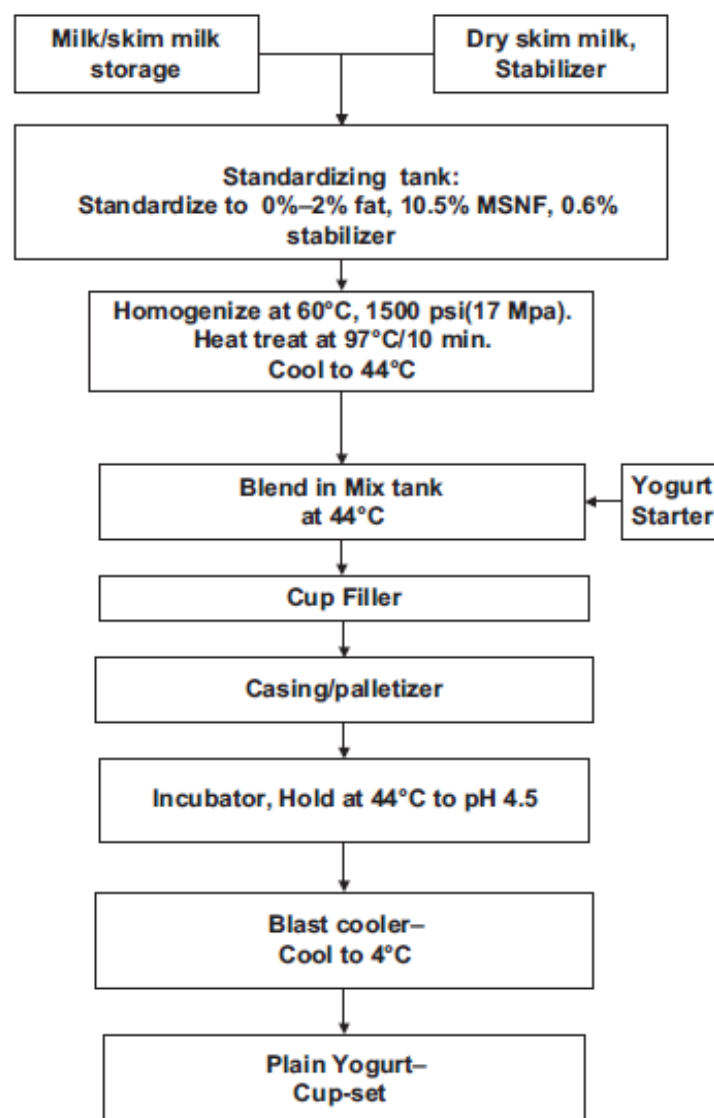


Figure 4. Schéma de fabrication de yaourt nature (Chandan, 2014).

8. Enrichissement du yaourt

8.1. Consommation de yaourts et effets sur la santé

Évidemment, la valeur nutritive de tout aliment dépend de ses composants nutritionnels et diététiques. En raison de la présence de ces principaux composés nutritionnels dans le lait, le yaourt est inéluctablement aussi d'une grande importance alimentaire. Apparemment, la fermentation lactique n'induit pas de grand changement dans la composition chimique du lait et du yaourt. Toutefois, le processus de fermentation a un effet bénéfique sur le yaourt (Walstra et al, 2010).

La consommation de produits laitiers fermentés contenant des bactéries probiotiques semble diminuer l'absorption du cholestérol. Les effets bénéfiques des produits laitiers sur la masse grasse corporelle peuvent être causés par les protéines de lactosérum, les acides gras à chaîne moyenne et d'autres substances minérales (Anderson et Gilliland, 1999).

8.2. Fortification des produits laitiers

Les produits laitiers, y compris les boissons, couvrent les apports nutritionnels quotidiens à 52 % en calcium, à 52 % en vitamine D, à 27 % en vitamine A, à 26 % en phosphore, à 25 % en vitamine B12, à 26 % des graisses saturées, à 14 % en graisses totales, à 10 % en sodium et à 10 % en calories totales du régime chez les adultes (Cifelli et al., 2017). Au-delà de la fonction bien établie d'améliorer la santé des os, des données plus récentes suggèrent que la consommation de lait et de produits laitiers est associée à un risque moindre d'obésité, de maladies cardiovasculaires et de diabète de type 2 (Thorning et al., 2016).

Les boissons à base de produits laitiers peuvent être enrichies d'antioxydants, d'acides gras ω -3, de protéines végétales en raison de leur plus grande acceptabilité par les consommateurs et d'exigence d'entreposage au froid (Corbo et al., 2014). En raison de la tendance croissante du marché des nutraceutiques, le yaourt a été également enrichi avec de nombreux composés et substances bioactives dont les minéraux et les vitamines liposolubles (A, D, E et K) (Gahruie et al., 2015).

8.2.1. Fortification avec des probiotiques

L'enrichissement avec les probiotiques est fréquemment rencontré dans les produits laitiers, car ils sont considérés comme des véhicules exceptionnels pour les micro-organismes probiotiques (Gürakan et al., 2009). Les bienfaits pour la santé attribués aux probiotiques

sont diverses ; par exemple, l'amélioration des symptômes d'intolérance au lactose, la diminution de l'hypertension, la gestion des symptômes liés au cancer du côlon, la réduction de l'eczéma atopique du nourrisson, l'amélioration des symptômes de la maladie de Crohn, le renforcement du fonctionnement immunitaire ainsi que la fourniture de macro et micronutriments (Iqbal et al., 2014).

En raison de leurs nombreux bienfaits sur la santé humaine, les bactéries probiotiques sont devenues le centre d'intérêt des industries alimentaires, en particulier l'industrie laitière (Grover et al., 2012). C'est pourquoi un nombre croissant de fabricants de produits laitiers ajoutent des espèces de *Lactobacillus* et de *Bifidobacterium* à certains de leurs produits transformés. Les bactéries probiotiques les plus fréquemment incluses sont *L. acidophilus*, *L. casei* et *L. rhamnosus* et *Bifidobacterium bifidum*. (Corbo et al., 2014).

8.2.2. Fortification en acides gras oméga-3

De nombreux composants bioactifs comme les acides gras oméga-3 (ω -3) sont également ajoutés aux boissons lactières commerciales en plus d'être enrichis en composants bioactifs comme l'ALA (α acide linoléique, C18:3n-3), l'EPA (acide eicosapentaénoïque, C20:5n-3) et le DHA (acide docosahexaénoïque, C22:6n-3) (Özer et Kirmaci, 2010). À l'heure actuelle, les boissons lactées enrichies en ω -3 sont le yaourt à boire, les boissons lactées, le lait frais et traité à l'UHT (Shahidi et Ambigaipalan, 2016).

8.2.3. Fortification par des peptides bioactifs

Les peptides bioactifs peuvent être obtenus à partir de la protéolyse de diverses protéines par des enzymes et également produits pendant la digestion intestinale des nutriments. Ces peptides agissent comme un régulateur physiologique potentiel du métabolisme. Récemment, une grande attention a été accordée à l'étude des rôles bioactifs des peptides comme antioxydants, antihypertenseurs, hypocholestérolémiques, anti-inflammatoires et immunomodulateurs (Hernández-Ledesma et al., 2014).

8.2.4. Fortification avec des polyphénols

Les plantes produisent une grande quantité de métabolites secondaires afin de mieux s'adapter aux conditions environnementales, de se protéger des attaques microbiennes et de résister aux stress biotiques et abiotiques. Parmi ces composés, les composés phénoliques ont fait l'objet d'une attention particulière ces dernières années en raison de leur pouvoir

antioxydant, anti-inflammatoire, antimutagène et anticoagulant qui a été corrélé à un risque réduit de maladies cardiovasculaires et de développement du cancer (**Fresco et al., 2010**). Les fruits constituent la principale source alimentaire de composés phénoliques. Il a été suggéré que les jus de fruits, les poudres et les extraits peuvent être utilisés comme ingrédients fonctionnels dans l'industrie alimentaire, y compris le secteur laitier (**Record et al., 2001**).

L'un des produits laitiers fermentés bien connus est le yaourt ; malgré ses caractéristiques nutritionnelles et son importance dans l'alimentation humaine, il n'est pas considéré comme une source majeure de composés phénoliques (**O'connell et Fox, 2001**). C'est pourquoi des additifs à base de plantes ont été appliqués pour améliorer la teneur en composés phénoliques du yaourt (**O'connell et Fox, 2001**). Dans une autre étude, le yaourt a été enrichi avec des extraits d'éthanol acidifié de quatre types de raisins qui ont été considérés comme des ingrédients fonctionnels (**Karaaslan et al., 2011**).

8.2.5. Enrichissement en vitamines

Les vitamines sont des composés qui jouent un rôle de cofacteurs dans l'organisme. Les produits laitiers fermentés comme le yaourt peuvent être considérés comme des sources de vitamines notamment du groupe B en raison de la capacité de certains starters à les synthétiser (**Webb et al., 1988**). Il n'y a pas suffisamment de vitamines D, A et C dans les produits laitiers à faibles teneurs en gras. Habituellement, ces produits sont enrichis seulement en vitamine D et A, mais pas en vitamine C ; ce qui diminue de leur qualité nutritionnel (**Dave et Shah, 1997**).

La vitamine A ajoutée à des doses de 25000 à 50000 UI sont très toxiques chez les adultes et les enfants ; alors que les provitamines comme le carotène ne sont pas toxiques. Il est donc recommandé d'utiliser la β -carotène pour l'enrichissement des produits laitiers (**Preedy et al., 2013**).

CHAPITRE II

*Thymus vulgaris : Composés
bioactifs, Méthodes d'extraction
et Intérêt thérapeutique*

1. Introduction

Thymus vulgaris est une plante florifère annuelle de la famille des Lamiacées, communément appelée « Thym », elle est originaire du sud de l'Europe, distribuée dans le monde entier (**Hosseinzadeh et al., 2015**). Le thym provient de la région méditerranéenne et des pays voisins, Afrique du nord, et dans certaines parties d'Asie. En Afrique du nord, la plante est cultivée depuis des siècles en Algérie, en Egypte, en Libye, au Maroc et en Tunisie. *T. vulgaris* est une espèce utilisée largement en cuisine et en phytothérapie (**Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**).

2. Culture et distribution du *T. vulgaris*

T. vulgaris est une plante aromatique utilisée à des fins culinaires et médicinales presque partout dans le monde. La plante fleurit et peut atteindre jusqu'à 30 cm de haut. Le thym est un arbuste vivace minuscule dont les tiges deviennent ligneuses avec l'âge (**Hosseinzadeh et al., 2015**). En Algérie, le thym est largement répandu, constitue un remède important utilisé depuis des siècles et identifié comme une bonne source de composés bioactifs possédant des propriétés antioxydantes et anti-inflammatoires importantes (**Mansouri et al., 2018**). Il est représenté par plusieurs espèces difficiles à déterminer à cause de leur variabilité et leur tendance à s'hybrider facilement. Sa répartition géographique est représentée dans le **Tableau 1**.

T. vulgaris se cultive mieux dans des endroits chauds et ensoleillé avec un sol bien drainé et est généralement planté au printemps. La plante peut être reproduite par semis, boutures ou par division des sections racinées. La plante peut pousser dans de très basses températures à l'état sauvage en hauts plateaux montagneux (**Hosseinzadeh et al., 2015**). Les feuilles de *T. vulgaris* sont un peu charnues avec une forme ovale (**Figure 3**), elles sont souvent utilisées pour la production d'huile volatile généralement par distillation à la vapeur. Le thym est habituellement produit à des fins commerciales pour la production des feuilles séchées, huile de thym, extraits de thym et oléorésines (**Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**).

Tableau 1. Répartition des principales espèces du thym en Algérie. ((Saidj, 2006)

Espèces	Découverte par	Localisation	Nom local
<i>Thymus Capitatus</i>	Hoffman et Link	Tlemcen	Zaâteure
<i>Thymus Fontanasi</i>	Boiss et Reuter	Est de L'Algérie	Zaâteure
<i>Thymus Commutatus</i>	Battandier	Endémique Oran	/
<i>Thymus numidicus</i>	Poiret	Atlas tellien, La grande et la petite Kabylie, Tell Constantinois	Tizaâtarte
<i>Thymus Guyonii</i>	Noé	Hauts plateaux algérois- oranais et constantinois	/
<i>Thymus Lancéolatus</i>	Desfontaine	Hauts Plateaux algérois, oranais et constantinois	Zaâteur
<i>Thymus Pallidus</i>	Coss	Secteur de l'atlas Saharien, et constantinois	Tizerdite
<i>Thymus Hirtus</i>	Willd	Commun sauf sur le littoral	Djertil Hamrya
<i>Thymus Algériensis</i>	Boiss et Reuter	Secteur des Hauts Plateaux algérois et oranais	Djertil Zâitra
<i>Thymus Glandulosus</i>	Lag	Secteur des Hauts Plateaux Algérois	/
<i>Thymus Munbanus</i>	Boiss et Reuter	Endémique Nord algérois	Djertil
<i>Thymus vulgaris L.</i>	Desfontaine	Atlas tellien, haut plateaux Algérois, oranais et constantinois.	Zaâteur

3. Classification

Le genre *Thymus* est l'un des plus grands genres de la famille des Lamiacées en termes de nombre d'espèces qu'il possède. Selon les informations actuelles, il existe 214 espèces et 36 sous-espèces (Moradi, 2014). Sur 250 espèces et sous-espèces, seules cinq espèces ont une importance économique, à savoir *Thymus vulgaris L* (thym commun), *Thymus serpyllum L* (thym sauvage), *Thymus zygis L* (thym espagnol), *Thymus capitatus* ou récemment *Thymbra capitata L* (origan espagnol ou thym à tête conique) et *Thymus mastichina L* (marjolaine espagnole) (Stahl-Biskup et Sàez, 2002).

Selon le Département de l'Agriculture des États-Unis (USDA), la Classification pour le Kingdom Plantae jusqu'à l'espèce *Thymus vulgaris* est la suivante (Anonyme 1, 2020) :

Règne : Plantae

Sous-règne : Tracheobionta

Superdivision : Spermatophyta

Division : Magnoliophyta

Classe : Magnoliopsida

Sous-classe : Asteridae

Ordre : Lamiales

Famille : Lamiacées

Genre : *Thymus*

Espèce : *Thymus vulgaris*

4. Composition du de *T. vulgaris*

Les constituants phytochimiques du thym comprennent les phénols, les terpénoïdes et surtout le thymol, l'eugénol et les saponines. L'huile essentielle de thym présente une teneur élevée en monoterpènes oxygénés (56,53 %) et une faible teneur en hydrocarbures monoterpéniques (28,69 %), sesquiterpéniques (5,04 %) et sesquiterpéniques oxygénés (1,84 %) (Reddy et al., 2014)

4.1. Huiles essentielles de *T. vulgaris*

L'huile essentielle du thym est responsable de l'arôme piquante typique. Le composé prédominant parmi les composants de l'huile essentielle a été identifié comme étant le thymol (à 51,34%) tandis que la quantité de tous les autres composants était inférieure à 19 % (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012). *T. vulgaris* séché peut contenir de 1 à 2,5% d'huile essentielle. La plupart des substances volatiles détectées dans l'huile de thym appartiennent au groupe des monoterpènes avec le thymol comme composé majoritaire (30 à 55%) (Reddy et al., 2014).

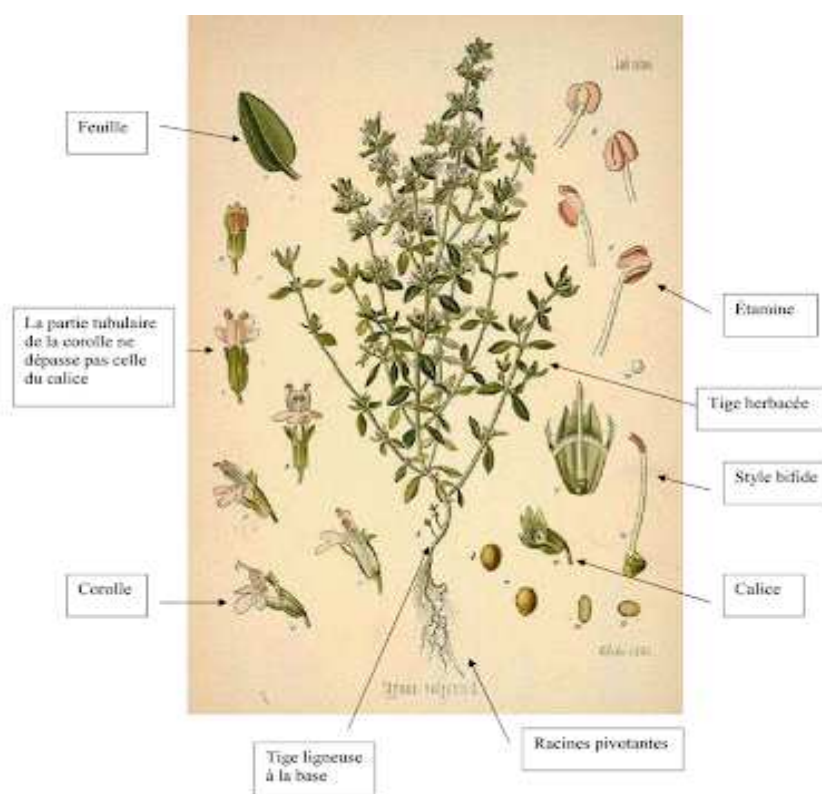


Figure 5. *T. vulgaris* (Anonyme 2, 2022)

4.2. Polyphénols et autre composé

Outre les principaux constituants de l'huile essentielle, le thym contient également des composés phénoliques (**Figure 4**), comme l'acide rosmarinique (**17**) (**Kivilompolo et Hyotylainen, 2007; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**), l'acide caféique (**18**), l'acide gentisique (**19**), l'acide p-coumarique (**20**), l'acide férulique (**21**) et l'acide p-hydroxybenzoïque (**Kivilompolo et Hyotylainen, 2007**), ainsi qu' environ vingt-cinq différents flavonoïdes (**Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**) dont des flavones tels l'apigénine (**22**), la lutéoline (**23**), la 6-hydroxylutéoline et les méthylflavones comme: le cirsilineol (**24**), le 8-méthoxycirsilineol, le cirsimaritrine (**25**), le 5-desméthylnobiletin (**26**), le 5-desmethylnobiletin (**27**), le gardenin B (**28**), le genkwanin (**29**), le 7-méthoxylutéolin, le salvigenin (**30**), le sideritoflavone (**31**), la thymonine (**32**), la thymusine (**33**) et le xanthomicrol (**34**) (**Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**).

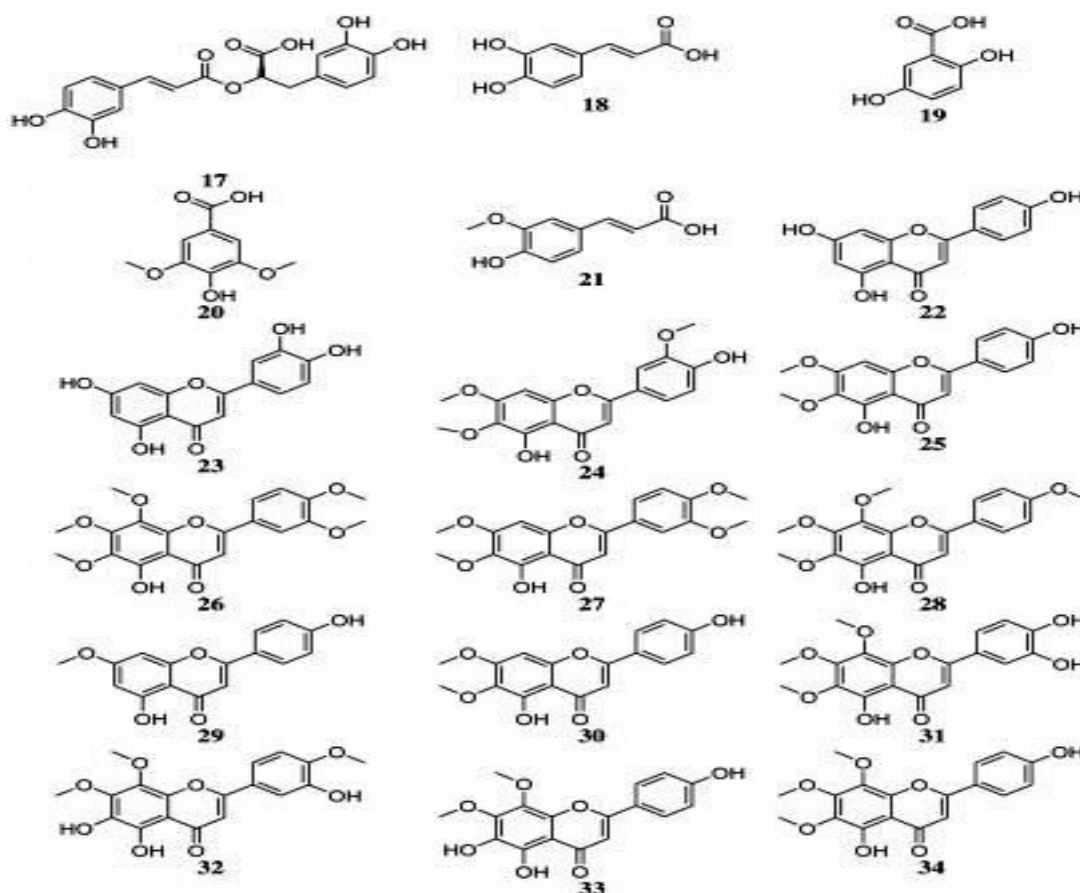


Figure 6. Constituants phénoliques de *T. vulgaris* ((**Kivilompolo et Hyotylainen, 2007 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012**).

5. Bioactivité de *T. vulgaris*

Le thym a été utilisé dans l'industrie alimentaire et l'industrie des arômes comme exhausteur de goût dans une grande variété d'aliments, de boissons et de confiseries, ainsi que comme agent de conservation alimentaire, en raison de ses propriétés antimicrobiennes et antioxydantes. Outre ces effets, le thym présente une variété d'activités biologiques (**Kuete, 2017**).

5.1. Activités anti-inflammatoires

Des extraits de thym ont été signalés pour leur activité anti-inflammatoire. Il réduit la production et l'expression génétique des médiateurs pro-inflammatoires, tels que le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- α), l'interleukine-1 bêta (IL-1 β) et l'interleukine-6 (IL-6), et augmente l'expression de la cytokine anti-inflammatoire interleukine-10 (IL-10) (**Ocana et Reglero, 2012**). Le thymol, un constituant majeur du thym, présente des effets anti-inflammatoires in vivo et in vitro. Le prétraitement de l'asthme induit par l'ovalbumine (OVA) chez la souris avec le thymol a permis de réduire le taux d'immunoglobuline E spécifique aux OVA, d'inhiber le recrutement des cellules inflammatoires dans les voies respiratoires et de diminuer les taux d'IL-4, IL-5 et IL-13 dans le liquide de lavage bronchoalvéolaire (**Zhou et al., 2014**).

5.2. Activités antimicrobiennes

Les plantes du genre *Thymus* sont d'importantes plantes médicinales, connues pour contenir des agents antimicrobiens, et sont riches en différentes substances actives, comme le p-cymène et le γ -terpinène. Diverses préparations, y compris des huiles essentielles, des extraits bruts et des constituants de *T. vulgaris* ont été signalées pour leurs propriétés antibactériennes, antifongiques et antivirales (**Nabavi et al., 2015**).

5.2.1. Activité antibactérienne

Tohidpour et al. (2010) ont démontré l'activité antibactérienne de l'huile essentielle de thym sur un panel de 14 isolats cliniques de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline et d'autres souches bactériennes standard, telles que *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*. **Sienkiewicz et al. (2011)** ont également signalé une forte

activité antibactérienne des huiles essentielles contre 120 souches appartenant aux genres *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Escherichia* et *Pseudomonas*.

5.2.2. Activité antifongique

L'huile essentielle de thym a été signalée pour ses effets antifongiques contre les champignons de détérioration des aliments, y compris les espèces *Aspergillus*, comme *A. oryzae*, *A. brasiliensis*, *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* et *Fusarium moniliforme* (Mandal et DebMandal, 2016). L'évaluation morphologique par microscopie optique et microscopie électronique à balayage a démontré l'activité antifongique des huiles essentielles de thym à 50 µg/ml et leur effet fongicide à 250 µg/ml contre *A. flavus* (Kohiyama et al., 2015).

5.2.3. Activité antivirale

L'extrait d'éthanol à 80 % de *T. vulgaris* avait une activité antivirale contre le virus de la maladie de Newcastle, réduisant la puissance virale de plus de 56 fois (Rezatofighi et al., 2014). Les activités antivirales du thym ont également été signalées contre les virus de l'herpès simplex 1 et 2, ainsi que contre les souches du virus de l'herpès simplex 1 résistant à l'acyclovir (Nolkemper et al., 2006).

5.3. Activité antioxydante

Les phénols de thym ont une excellente activité antioxydante qui peut être supérieure à celle du butylhydroxytoluène et du α -tocophérol (Lee et Shibamoto, 2002). L'huile essentielle de thym aurait un effet antioxydant efficace, il agit en tant que piègeur de radicaux libres (valeur CI_{50} de 18,6 µg/ml), protégeant les lipides de l'oxydation pendant l'entreposage (Miladi et al., 2013).

6. Innocuité et toxicité de *Thymus vulgaris*

T. vulgaris a reçu le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) de l'Administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA), ce qui signifie que les plantes sont généralement reconnues comme étant sans danger pour la consommation humaine sans limitation d'ingestion (Grespan et al., 2014). Lors des essais oraux, l'huile essentielle du thym a montré une DL50 élevée (4 mg/kg), ce qui suggère la sécurité et la non-toxicité de cette huile pour les animaux. Il devrait y avoir des restrictions sur l'utilisation du thym en cas

d'hypertension artérielle, certains chémotypes contenant des concentrations élevées de thymol et de carvacrol sont toxiques et devraient être évitées en aromathérapie (Newall et al., 1996).

7. Principales utilisations dans l'industrie alimentaire

L'huile essentielle du thym est utilisée comme exhausteur de goût dans une grande variété d'aliments, de boissons et de confiseries ; il possède également des propriétés antimicrobiennes et antioxydantes, et est donc utilisé comme agent de conservation alimentaire (Mandal et DebMandal, 2016). Les extraits de *T. vulgaris* possèdent une excellente activité antioxydante mieux que celle des antioxydants synthétiques. Les connaissances actuelles sur l'utilisation et les applications de *T. vulgaris* en science alimentaire sont dues à des recherches sur ses activités biologiques menées sur des extraits, des huiles essentielles ou des composés purs isolés de la plante (Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012).

7.1. Plante fraîche et séchée

L'utilisation du thym séché dans la transformation des aliments est limitée, l'industrie a besoin de traitements supplémentaires pour répondre à certains paramètres de qualité. Les feuilles peuvent être coupées ou tranchées, cassées ou frottées et broyées (Kowalski et Wawrzykowski, 2009). Le taux d'humidité du thym broyé est important à la fois pour la stabilité et la valeur gustative. Il doit être suffisamment sec pour éviter une odeur et une saveur de moisi, tout en étant humide pour conserver le caractère optimal de l'odeur et de la saveur (Reineccius, 2006).

7.2. Extraits de thym et produits transformés

En raison des inconvénients du thym broyé, les industriels reconnaissent de plus en plus les avantages des assaisonnements à base de plantes extractibles. Les produits d'extraction les plus importants obtenus à partir du thym sont les huiles essentielles, les oléorésines d'herbes et les extraits phénoliques (Reineccius, 2006).

Pour éviter les inconvénients des huiles essentielles et des oléorésines de thym, elles peuvent être transformées pour obtenir des produits de pointe tels que les produits solubilisés (solution vraie en mélange avec de l'eau). Par exemple, avec des produits dispersés, il est possible d'obtenir un profil et une puissance d'aromatisation normalisés. Habituellement, ces produits sont adaptés à une application alimentaire spécifique et contiennent des mélanges

d'huiles essentielles et/ou d'oléorésines. Les extraits de thym sont utilisés dans de nombreux arômes et assaisonnements (Kowalski et Wawrzykowski, 2009).

Jacobo-Velazquez et al. (2013) ont signalé l'utilisation d'extraits phénoliques de romarin et de thym dans une matrice d'avocat afin de réduire l'activité résiduelle des enzymes oxydantes dans les aliments transformés sous pression hydrostatique élevée. Toutefois, il a été signalé que l'ajout de ces extraits naturels contribuait au brunissement enzymatique en fournissant des substrats potentiels pour la polyphénol oxydase, (González-Cebrino et al., 2013).

8. Extraction des composés bioactifs

Les herbes aromatiques et médicinales sont très riches en polyphénols. Le thym (*Thymus vulgaris*), le romarin (*Rosmarinus officinalis*), l'origan (*Origanum vulgare*), la sauge (*Salvia officinalis*), la marjolaine (*Majorana syriaca*) et la sarriette d'hiver (*Satureja thymbra*) sont les principales sources de polyphénols. Jusqu'à aujourd'hui, leur exploitation pour la récupération des polyphénols qui pourraient être ajoutés comme antioxydants aux aliments, compléments alimentaires ou cosmétiques a été très limitée (Oreopoulou et al., 2019).

Les composés phénoliques dans les plantes sont renfermés dans des structures vacuolaires insolubles, ce qui rend leur extraction plus difficile (Corrales et al. 2008). De plus, ils peuvent se lier aux sucres et aux protéines ou être estérifiés avec des acides organiques acétylés ou d'autres dérivés polymérisés (Zlotek et al., 2016). La directive 2009/32/CE de la commission européenne précise que le méthanol, l'éthanol, l'acétone, l'hexane et le CO₂ supercritique sont les solvants autorisés pour l'extraction des composés antioxydants. Cependant, le solvant choisi pour l'extraction des polyphénols dépend de la matrice solide, c'est-à-dire de la matière première, de la polarité des composés que l'on veut extraire et de la pureté souhaitée des extraits (Drużyńska et al., 2007).

L'extraction de polyphénols est la conséquence de deux phénomènes : la dissolution de chaque polyphénol au niveau cellulaire dans la matrice végétale, et leur diffusion dans l'environnement externe (solvant) (Shi et al., 2003). Il n'est possible de poursuivre la séparation, l'identification et la caractérisation des composés cibles qu'après un processus d'extraction approprié (Azmir et al., 2013).

Malgré plusieurs inconvénients tels que la faible efficacité et l'utilisation de volumes élevés de solvants, les techniques d'extraction conventionnelles restent les procédures les plus couramment utilisées, en raison de leur facilité d'utilisation, de leur efficacité, de leur large gamme d'applicabilité et de leurs faibles coûts économiques (**Brglez Mojzer et al., 2016**).

8.1. Techniques d'extraction des composés actifs

L'extraction des polyphénols, des acides phénoliques et d'autres ingrédients bioactifs des plantes a été étudiée par de nombreux chercheurs. Les méthodes conventionnelles sont basées sur l'extraction solide-liquide avec différents solvants. Les principes de ces méthodes et les paramètres qui les influencent, ainsi qu'une comparaison relative entre eux, ont été consignés dans plusieurs études (**Ignat et al., 2011**).

8.1.1. Extraction par Soxhlet

L'appareil d'extraction Soxhlet a été inventé en 1879 par Franz von Soxhlet. Cet appareil est utilisé principalement pour dissoudre les espèces faiblement solubles des matrices solides. La méthode Soxhlet a été la méthode la plus courante pour isoler les composés bioactifs des plantes et la principale référence pour évaluer la performance des autres méthodes innovantes (**Da Porto et al., 2013**).

Les solvants doivent avoir des propriétés adéquates telles que le coefficient de distribution, la sélectivité, la solvatisation, la récupérabilité, la densité, la tension interfaciale et la réactivité chimique. L'extraction par Soxhlet dépend fortement des caractéristiques de la matrice et de la taille des particules car la diffusion interne peut être l'étape limite pendant l'extraction (**Oreopoulou et al., 2019**).

Les principaux inconvénients sont le temps d'extraction (6h) et la grande quantité de solvant utilisée. De plus, aucune agitation ne peut être fournie dans l'appareil afin d'accélérer le processus. Enfin, la possibilité de décomposition thermique des composés cibles ne peut être ignorée car l'extraction se produit généralement au point d'ébullition du solvant pendant une longue période (**Luque de Castro et Priego Capote, 2010**).

8.1.2. Hydrodistillation

L'hydrodistillation est une méthode traditionnelle d'extraction de composés bioactifs, principalement les huiles essentielles des plantes. Les solvants organiques ne sont pas

impliqués et peuvent être utilisés avant la déshydratation des matières végétales. L'hydrodistillation implique trois processus physico-chimiques : l'hydrodiffusion, l'hydrolyse et la décomposition par la chaleur (Azmir et al., 2013).

Il existe trois types d'hydrodistillation (Vankar, 2004) la distillation à l'eau, la distillation eau-vapeur et la distillation à la vapeur.

Lors de l'hydrodistillation, le matériel végétal est d'abord placé dans un compartiment, puis l'eau est ajoutée en quantité suffisante puis portée à ébullition. Alternativement, de la vapeur directe est injectée dans le matériel végétal. Le refroidissement indirect par l'eau condense le mélange de vapeur d'eau et de l'huile. Le mélange condensé s'écoule du condenseur vers un séparateur, où l'huile et les composés bioactifs se séparent automatiquement de l'eau (Silva et al., 2005).

8.1.3 Macération

La macération est devenue populaire car c'est un moyen simple et peu coûteux d'extraire les composés phénoliques. Dans ce processus, le matériel végétal, entier ou écrasé, est placé dans un récipient fermé, de même que le solvant. Le système est laissé à la température ambiante pendant plusieurs heures, voire plusieurs jours, avec agitation occasionnelle. Le mélange est ensuite filtré, le résidu solide est pressé pour récupérer une grande partie de la solution. Le liquide obtenu est séparé des impuretés par filtration. Le liquide final filtré est évaporé et concentré (Oreopoulou et al., 2019).

8.1.4 Extraction par agitation

L'extraction par agitation au solvant est un procédé conçu pour séparer les composants solubles en les transférant d'une matrice solide perméable insoluble (plante) à un solvant liquide. Les solvants organiques sont souvent utilisés pour extraire les composés phénoliques. Quatre étapes de transfert de masse sont impliquées, mais la diffusion du soluté dissous dans le solide est l'étape limite (Gertenbach, 2001). Dans un premier temps, les particules solides de la plante sont gonflées par la sorption du solvant de la phase solide. La sorption est causée par les forces osmotiques, par les phénomènes capillaires et par la dissolution des ions dans les cellules. La deuxième étape consiste à dissoudre les solutés, par exemple les polyphénols, dans le solvant. La diffusion d'un soluté dans la phase solide est l'étape suivante et est généralement celle du contrôle du débit. Lors de l'extraction de

composants phénoliques colorés, tels que les anthocyanines, les étapes de diffusion sont facilement perceptibles par le changement de couleur de la solution (**Oreopoulou et al., 2019**).

8.2. Effet des paramètres d'extraction

8.2.1. Solvant d'extraction

Plusieurs solvants ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols de différentes plantes. L'efficacité d'un solvant dépend principalement de sa capacité à dissoudre des groupes phénoliques spécifiques. De plus, le solvant peut influencer la perméabilité des cellules végétales par une altération chimique ou biophysique. Par exemple, l'éthanol augmente la perméabilité cellulaire en affectant la bicouche phospholipidique de la membrane (**Boussetta et al., 2014 ; Xi et al., 2009**).

Le méthanol et l'éthanol sont les solvants les plus utilisés pour l'extraction quantitative des polyphénols des plantes aromatiques. Alternativement, l'extraction successive avec des solvants de polarité croissante peut fournir des fractions avec différents groupes de polyphénols (**Oreopoulou et al., 2019**). Des mélanges de méthanol ou d'éthanol avec de l'eau ont été utilisés avec succès. L'éthanol présente un profil en composés phénoliques ainsi que des rendements similaires à ceux du méthanol (**Majeed et al, 2016**).

Les solutions d'éthanol dans l'eau (50 %) ont été plus efficaces que l'eau pure pour l'extraction des acides phénoliques des graines de lin (**Boussetta et al., 2014**). **Bernatoniene et al. (2016)** ont obtenu une forte récupération d'acide rosmarinique à partir de feuilles de romarin à 70% d'éthanol dans l'eau, tandis qu'à 90% d'éthanol il a été enregistré des valeurs plus élevées en acide ursolique. **Oliveira et al. (2016)** ont examiné l'effet des mélanges d'éthanol et de méthanol avec de l'eau sur le rendement en acide rosmarinique et en acide carnosique du romarin et ont conclu que, bien que le rendement optimal de chaque composé varie selon la polarité, les mélanges de choix pouvant aboutir à de meilleurs rendements d'extraction.

8.2.2. pH

Certains composés phénoliques, comme les acides hydroxycinnamiques et hydroxybenzoïque, sont liés de manière covalente aux polysaccharides des parois cellulaires

par des liaisons ester et aux composants lignine par des liaisons ester ou éther. En effet, l'acide p-coumarique peut être fortement estérifié ou étherifié à la lignine (**Max et al., 2010**).

Rajha et al. (2014) en ajoutant du NaOH (0,1 M) à l'eau ont observé une augmentation du rendement en polyphénols obtenu à partir des sarments de vigne. Ceci résulte sans doute de l'hydrolyse des liaisons ester des polyphénols liés à d'autres composants de la plante, ainsi que de l'élimination de la lignine entourant la cellule végétale.

D'après **Boussetta et al. (2014)** l'ajout de 0,05 à 0,3 M de NaOH à des solutions aqueuses d'éthanol à 20 % induit une augmentation allant jusqu'à 3,8 fois le rendement en polyphénols des graines de lin. En outre, **Corbin et al. (2015)** ont observé que l'extraction aqueuse avec du NaOH 0,2N facilite l'hydrolyse alcaline et donne des meilleurs rendements en glycosides d'acide hydroxycinnamiques.

8.2.3. Température

L'augmentation de la température d'extraction entraîne une plus grande perméabilité des parois cellulaires, une plus grande solubilité des composés phénoliques et des phénomènes de transfert de chaleur et de masse à travers la matrice végétale, ce qui se traduit par une augmentation du taux d'extraction et, éventuellement à une augmentation du rendement, à moins que des températures trop élevées puisse induire une légère dégradation de certains (**Oreopoulou et al., 2019**).

Des expériences avec les composés actifs de l'origan extraient par de l'éthanol à différentes températures ont révélé que la diffusion efficace des composés phénoliques totaux a augmenté d'environ 3,6 fois lorsque la température est augmentée de 20 °C. Selon **Li et al. (2006)** une augmentation de la température d'extraction, entre l'intervalle compris de 20 à 80°C, augmente l'hydrolyse des liaisons ester ou éther et par conséquent une libération quantitative plus importante de composés phénoliques.

8.2.4. Temps d'extraction

Le temps d'extraction de 1 à 10 heures a été rapporté comme étant efficace pour la récupération quantitative des composés phénoliques par extraction conventionnelle à partir de plantes aromatiques (**Rodriguez-Rojo et al., 2012**). Comme le processus est contrôlé par des phénomènes de transfert de masse, la taille des particules de la matière première est un facteur

important ; une taille de particules plus petite améliore la récupération quantitative à un temps d'extraction plus court (**Oliveira et al., 2016**).

L'utilisation des ultrasons améliore les phénomènes de transfert de masse et réduit le temps d'extraction nécessaire à l'obtention d'une masse maximale en polyphénols (**Hossain et al., 2012**). D'autre part, les ultrasons peuvent produire certains effets chimiques dus à la production de radicaux libres dans les bulles de cavitation. La sonication à l'eau entraîne la formation de radicaux hydroxyles très réactifs, qui peuvent se combiner pour former du peroxyde d'hydrogène et induire des phénomènes d'oxydation des composés phénoliques (**Oreopoulou et al., 2019**).

8.2.5. Rapport solvant / solide

Un rapport solvant/solide plus élevé accélère les phénomènes de transfert de masse en raison d'une plus grande différence de concentration entre la matrice solide et la phase liquide du solvant. Dans ces conditions, l'extraction est plus rapide mais la concentration des composés phénoliques dans l'extrait est plus faible ; la pureté de l'extrait peut être ainsi diminuée en raison de la co-extraction de composés indésirables (**Yang et Zhang, 2008 ; Oliveira et al., 2016**).

Yang et Zhang (2008) ont conclu que le rapport optimal pour la récupération de la quercétine et de la rutine d'une plante médicinale chinoise est de 40:1 (solvant/solide) ; alors qu'un ratio plus élevé ne permet pas d'obtenir un meilleur rendement. Dans une étude plus récente, un ratio de 20:1 s'est avéré efficace pour la récupération des principaux composés antioxydants phénoliques de l'origan et de sauge (**Majeed et al, 2016**).

Chapitre III

Les polyphénols : Classification, Biodisponibilité, Applications et Interactions

1. Définition

Les polyphénols sont les composés secondaires les plus répandus dans le règne végétal (Ross et Kasum, 2002). Se sont le résultat du métabolisme secondaire des plantes et sont dérivés à la fois de la voie dite de shikimate (phénylalanine) et de la voie acétate-malonate (La malonyl-coenzyme A) par plusieurs étapes enzymatiques (Arts et Hollman, 2005). La transformation de la phénylalanine à l'acide cinnamique par l'enzyme phénylalanine ammonia-lyase (PAL) est la première étape de la biosynthèse des polyphénols (Figure 7).

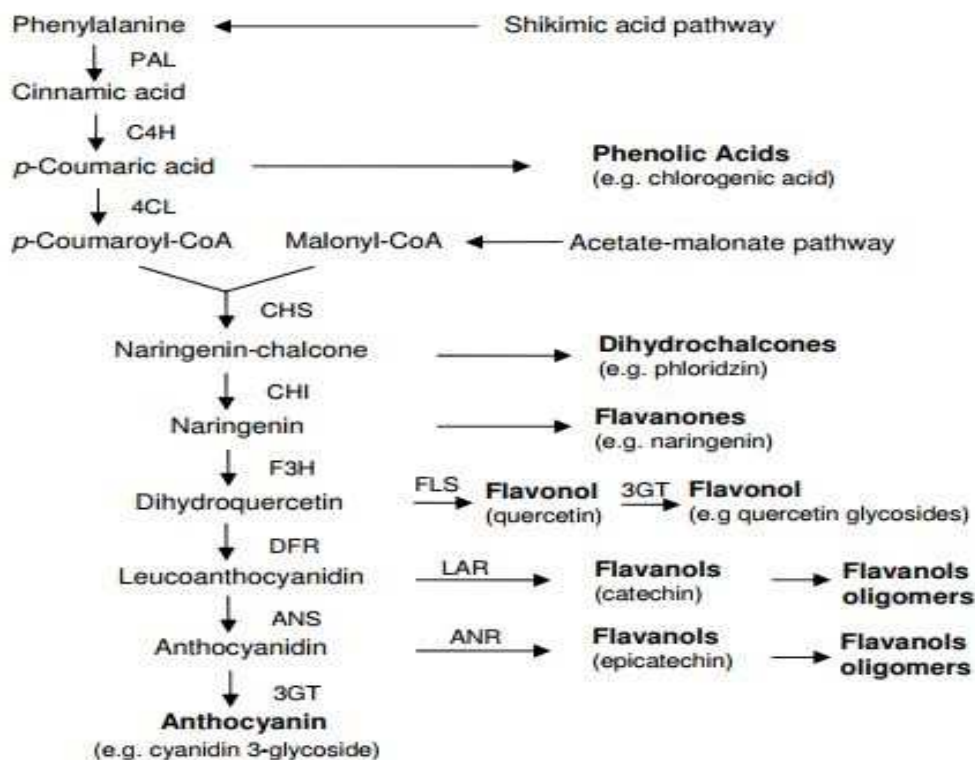


Figure 7. Voie de biosynthèse des polyphénols chez les plantes (Awad *et al.*, 2001).

2. Classification

Il existe plus de 8000 composés polyphénoliques qui peuvent être divisés en différents groupes en fonction de leur structure chimique (D'Archivio *et al.*, 2007). Les principaux groupes de polyphénols sont les flavonoïdes, les acides phénoliques, les lignanes et les stilbènes.

2.1. Flavonoïdes

Les flavonoïdes sont le groupe de polyphénols le plus courant et le plus largement distribué qui sont présents dans les plantes, avec plus de 4000 variétés. Ils sont également les

plus abondants dans notre alimentation, représentant les deux tiers de l'apport total en polyphénols (Scalbert et Williamson, 2000).

Les flavonoïdes partagent une structure de base commune ; le squelette du diphenylpropane. Le squelette du diphenylpropane (C₆-C₃-C₆) est constitué de deux cycles benzéniques (A et B) reliés par une chaîne à trois atomes de carbone. Ces trois chaînes de carbone forment un anneau de pyrane fermé (C). Différent degré d'hydroxylation et d'oxydation du cycle hétérocyclique C-pyrane donnent lieu à six sous-classes de flavonoïdes : flavonols, flavones, flavanols, flavanones, anthocyanines et isoflavones (Figure 8) (Manach et al., 2004).

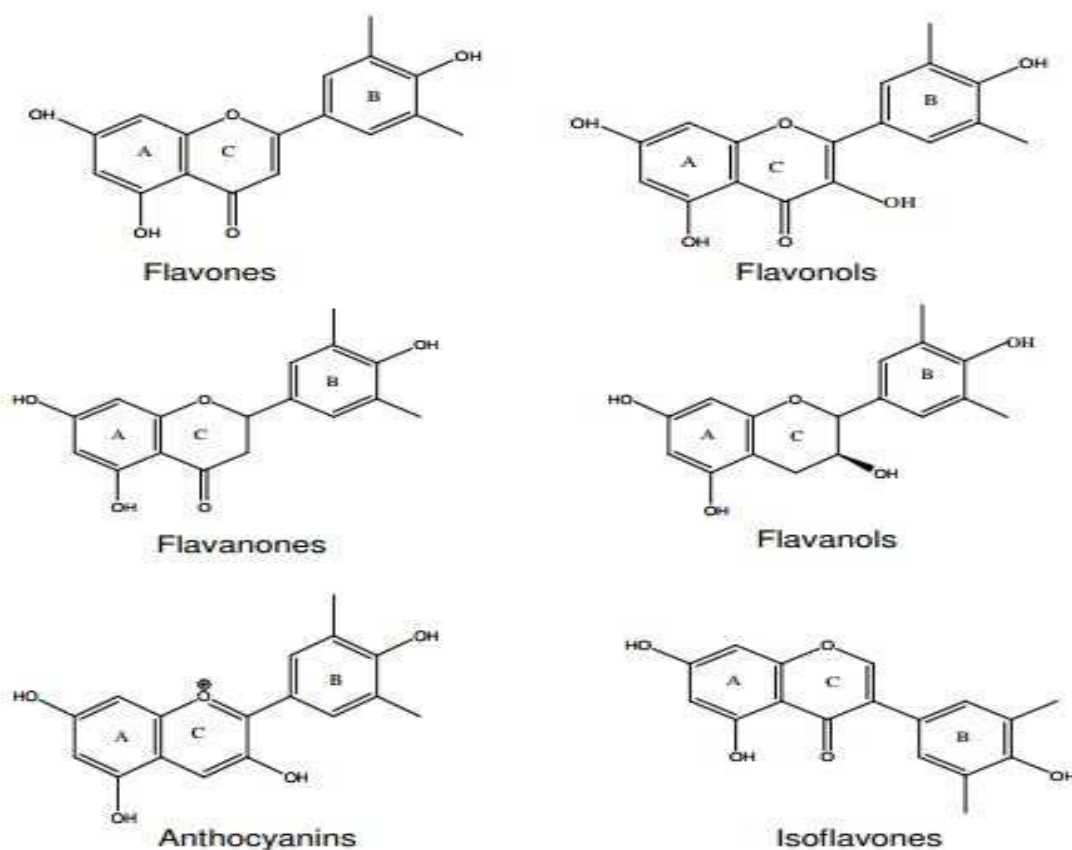


Figure 8. Structures chimiques des flavonoïdes (Manach et al., 2004).

2.2. Acides phénoliques

Les acides phénoliques sont abondants dans les aliments et représentent un tiers de l'apport total de polyphénols dans l'alimentation (Scalbert et Williamson, 2000). Les acides phénoliques présents dans les plantes sont des dérivés hydroxylés de l'acide benzoïque et de l'acide cinnamique (Manach et al., 2004 ; D'Archivio et al., 2007).

Les acides hydroxybenzoïque se trouvent dans quelques plantes qui sont consommées dans l'alimentation humaine. Les plantes comestibles contenant des acides hydroxybenzoïque ont généralement une très faible teneur en acides hydroxybenzoïque, à l'exception de certains fruits rouges (par ex. mûres), radis noirs et oignons (**Manach et al., 2004 ; D'Archivio et al., 2007**).

Les acides hydroxycinnamiques se composent principalement d'acides p-coumarique, caféique, férulique et sinapique. Ils se présentent rarement sous forme libre et leurs formes liées sont glycosylées ou sous forme d'esters de l'acide quinique, shikimique ou tartrique (**Manach et al., 2004**).

2.3. Lignanes

Les lignanes sont formés par dimérisation oxydative de deux unités de phénylpropane. Les lignanes comprennent le sécoisolariciresinol, le matairesinol, le pinoresinol et le lariciresinol. La source alimentaire la plus riche en lignanes est l'huile de lin, qui contient du sécoisolariciresinol et du matairesinol (**Manach et al., 2004**).

2.4. Stilbènes

Les stilbènes ne sont pas très répandus dans les plantes et ne se trouvent qu'en faibles quantités dans l'alimentation humaine. Le principal composant du stilbène est le resvératrol qui a suscité beaucoup d'intérêt en raison de ses propriétés anticancérogènes (**Scalbert et Williamson, 2000 ; Manach et al., 2004**).

3. Biodisponibilité, absorption et métabolisme des polyphénols

3.1. Biodisponibilité

L'évaluation de la biodisponibilité des polyphénols dans les aliments est un aspect important de l'étude du rôle des polyphénols dans la santé humaine. La biodisponibilité est définie comme étant la fraction d'un nutriment ou d'un composé ingéré qui atteint la circulation systémique et des sites spécifiques où il peut exercer son action biologique (**Porrini et Riso, 2008**).

La biodisponibilité des polyphénols est habituellement évaluée à partir de la pharmacocinétique plasmatique et/ou de l'excrétion urinaire. Des études de biodisponibilité ont montré que les polyphénols sont présents dans la circulation générale après l'ingestion

d'un repas riche en polyphénols. Cela indique qu'au moins une partie de la dose ingérée peut être absorbée (Moyle, 2011).

Manach et al. (2005) font état d'un excellent examen de la biodisponibilité des polyphénols. Ces auteurs rapportent les valeurs moyennes des données pharmacocinétiques de la concentration plasmatique maximale [Cmax] et du temps nécessaire pour atteindre la concentration plasmatique maximale [Tmax]. Pour permettre les comparaisons entre les polyphénols, les données ont été normalisées de manière à ce que la dose représentative soit 50 mg (équivalent aglycone). L'acide gallique représentait le polyphénol le plus biodisponible, suivi des isoflavones.

3.2. Absorption

Les polyphénols existent dans les aliments et les boissons sous diverses formes chimiques ; la structure chimique joue un rôle important dans le taux et l'étendue de l'absorption, du métabolisme et de la biodisponibilité des polyphénols en circulation dans le plasma (Scalbert et Williamson, 2000). La première étape de l'absorption des polyphénols alimentaires est la déglycosylation car les flavonoïdes, à l'exception des flavanols, sont présents dans l'alimentation sous forme de glycosides. Selon le résidu de sucre fixé, l'hydrolyse et l'absorption des flavonoïdes peuvent se produire dans l'intestin grêle (Arts et al., 2004).

Dans le cas des flavonoïdes qui ne sont pas absorbés dans l'intestin grêle (p. ex. les flavonoïdes avec des substitutions de rhamnose), ceux-ci passent par l'intestin grêle jusqu'au côlon et sont ensuite hydrolysés par la microflore colique avant d'être absorbés (Hollman et al., 1997).

3.3. Métabolisme

Après absorption, les polyphénols sont soumis à une conjugaison dans l'intestin grêle et/ou dans le foie. Ils sont soumis à trois principaux types de conjugaison : méthylation, la sulfatation et la glucuronidation (Figure 9) (Crespy et al., 2001). Les flavonoïdes sont métabolisés par les glucuronosyl-transférases, l'uridine-5'-diphosphate, les sulfotransférases et les catéchol-O-méthyltransférases (Rice-Evans, 2001).

Les polyphénols conjugués peuvent également être sécrétés du foie dans la bile, ce qui entraîne leur transport dans l'intestin grêle pour déconjugaison ou passage dans le côlon. Une

fois parvenus au côlon, les polyphénols sont métabolisés par la microflore du côlon où les métabolites résultants sont réabsorbés ou excrétés dans les fèces (Donovan *et al.*, 2001).

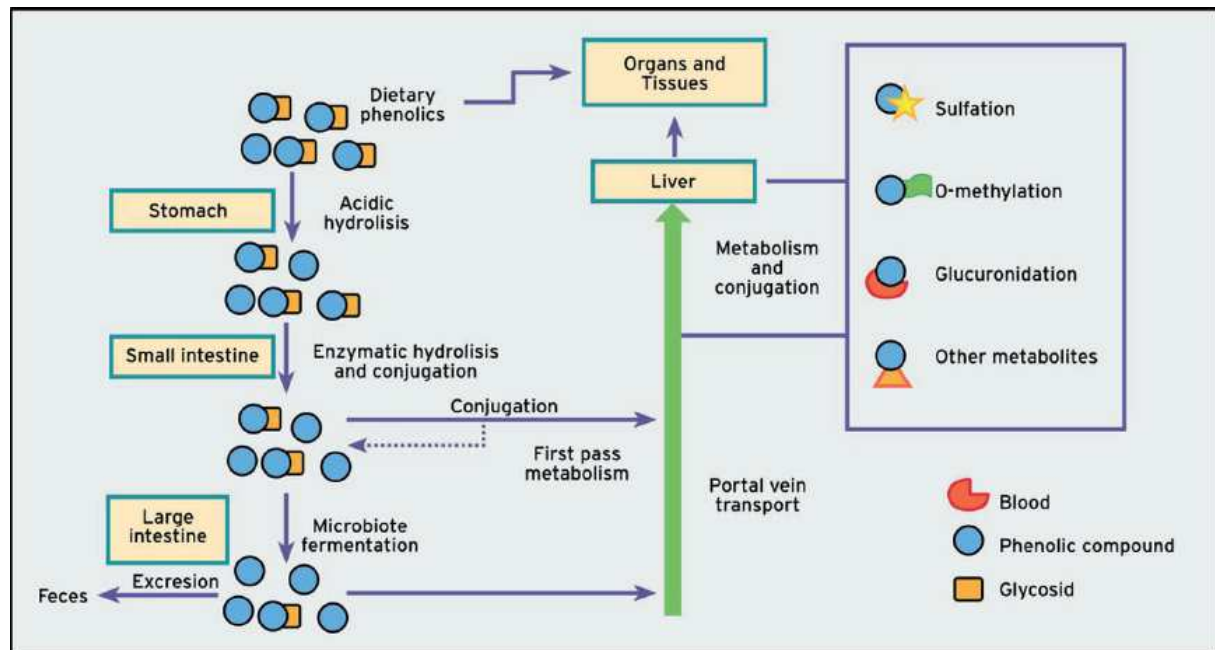


Figure 9. Absorption et métabolisme des polyphénols (Gutiérrez-Grijalva *et al.*, 2015).

4. Polyphénols et santé

4.1. Effets antioxydants des polyphénols

La capacité des polyphénols à protéger contre les maladies cardiovasculaires (MCV) peut être due à leur capacité à agir comme antioxydants. Il a été signalé que les polyphénols, en particulier les flavonoïdes, agissent comme antioxydants en raison de leur capacité à éliminer les radicaux libres et à supprimer la formation d'espèces réactives d'oxygène par l'inhibition des enzymes responsables de la production d'anions superoxyde et la chélation des éléments traces impliqués dans la production de radicaux libres (Pietta, 2000).

Les polyphénols interfèrent avec l'oxydation des lipides et d'autres molécules en donnant un atome d'hydrogène aux radicaux libres. D'après Bravo, (1998) l'efficacité des polyphénols à agir comme antioxydants dépend donc de leur structure et du nombre de groupes hydroxyle. Les flavonoïdes peuvent prévenir les lésions causées par les ROS de plusieurs façons, y compris par leur capacité de fonctionner comme capteurs directs de

radicaux, comme chélateurs des métaux et comme inhibiteurs de la xanthine oxydase et de la NADPH oxydase (Akhlaghi et Bandy 2009).

4.2. Effets antimicrobiens des polyphénols

Un essai de diffusion sur disque est habituellement utilisé pour évaluer la sensibilité in vitro aux antimicrobiens. A cet effet, les capacités antibactériennes potentielles des polyphénols ont fait l'objet d'un dépistage qualitatif par cette méthode (Xie et al., 2017). Les polyphénols montrent des effets inhibiteurs apparents sur la croissance de certaines bactéries ($\Phi > 8$ mm). Comparativement aux témoins positifs d'antibiotiques, la plupart des polyphénols ont montré des activités plus faibles, sauf les acides phénoliques ayant des effets antibactériens comparables à ceux des antibiotiques (Alarcon et al, 2008).

5. Application des polyphénols en industrie laitière

L'enrichissement des produits laitiers en composés bioactifs de sources naturelles s'est particulièrement généralisé au cours de la dernière décennie, en raison de la demande des consommateurs pour des aliments plus sains et plus fonctionnels. Les principaux produits laitiers étudiés pour l'ajout de polyphénols sont les laits fermentés et les fromages (Cutrim et Cortez, 2018).

Foda et al. (2010) ont étudié différentes concentrations d'huile essentielle de menthe verte (0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0 et 2,5 ml/kg de lait) et ses effets sur la constitution chimique et les propriétés sensorielles des fromages blancs. Il a été noté qu'une augmentation de la concentration en huile essentielle de menthe verte ne modifiait pas de manière significative la teneur en matière grasse et en humidité ($P > 0,05$) ; en revanche, la teneur en protéines augmentait de manière significative ($P < 0,05$).

Karaaslan et al. (2011) ont évalué l'impact de l'ajout d'extraits de quatre variétés de raisin (Syrah, Merlot, Cabernet Sauvignon et Chardonnay) sur les propriétés sensorielles et physico-chimiques du yaourt. Des panelistes ont analysé la texture, l'arôme, l'apparence et le goût, le yaourt Chardonnay a obtenu les scores les plus bas, qui étaient sensiblement différents des autres. En ce qui concerne leur arôme, leur pH et leur acidité, les échantillons ne différaient pas les uns des autres ($p > 0,05$).

Petrotos et al. (2012) ont également étudié l'influence de l'application de composés polyphénoliques dans le yaourt. Le yaourt traditionnel au lait de brebis de type grec et de type européen a été supplémenté par des polyphénols libres et micro-encapsulés provenant des eaux usées des moulins à huile. Il a été observé que le pH diminuait beaucoup plus rapidement dans les yaourts contenant des polyphénols dans la phase initiale d'incubation et que les polyphénols ajoutés avaient un effet protecteur qui évitait une baisse indésirable du pH pendant le stockage.

6. Interrelation entre les agents probiotiques et les polyphénols

Les polyphénols ont été impliqués dans plusieurs effets bénéfiques chez l'homme, tant sur le plan de la santé que de la maladie. Cependant, une mise en garde majeure concernant les polyphénols alimentaires est leur faible absorption et leur biodisponibilité qui limitent leur utilité. En fait, l'absorption alimentaire des polyphénols chez l'homme est souvent très limitée (10 à 20 %) et largement incomplète (**Kuhnle et al. 2000 ; Scalbert et al., 2002**).

L'excrétion fécale des polyphénols est relativement faible ; ainsi, une grande partie des polyphénols ingérés a tendance à s'accumuler dans la lumière du gros intestin où elle agit comme substrat pour le microbiote intestinal et est soumise à diverses modifications enzymatiques (par exemple, déglycosylation, déshydroxylation et déméthylation), ce qui donne lieu à une multitude de petits fragments et de nouveaux métabolites qui peuvent être efficacement absorbés (**Kemperman et al., 2010 ; Van Duynhoven et al., 2011**).

Il a été démontré que la transformation microbienne des polyphénols induit la formation de nouveaux composés bioactifs qui peuvent être détectés dans le plasma humain par rapport à celle, moins biodisponible (**Monagas et al., 2010 ; Cardona et al., 2013**). Une étude récente a démontré que l'extrait de pomme de terre riche en polyphénols contenant des acides chlorogéniques, caféique et férulique était fortement dégradé par le microbiote intestinal humain, entraînant la génération de métabolites phénoliques microbiens, tels que l'acide férulique, dihydrocaféique, 2-hydroxyphénylacétique, hydroxyphénylpropionique et coumarique, qui pourraient être efficacement absorbés (**Sadeghikbatan et al., 2018**).

Ces résultats conduisent à la conclusion que la transformation microbienne influence grandement la diversité, la bioactivité et l'absorption des polyphénols, et les polyphénols peuvent également moduler la composition du microbiome intestinal et les attributs

probiotiques des microbes commensaux (Sharma et Padwad, 2020). Ceci est révélateur d'une interrelation entre les phénols et les agents probiotiques qui peut être exploitée dans l'identification et le développement de produits alimentaires fonctionnels synbiotiques à base de phénols (Figure 10).

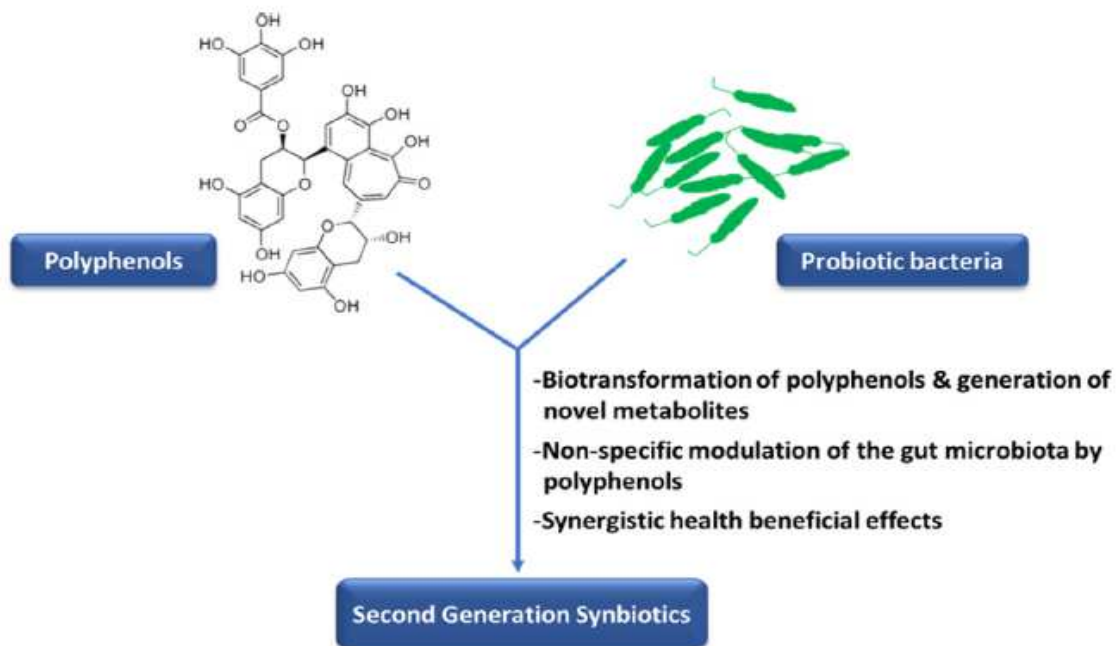


Figure 10. Interrelation entre les bactéries probiotiques et les polyphénols ((Sharma et Padwad, 2020).

Partie 2

Etude expérimentale

Partie 2 : Etude expérimentale.

1. Objectifs

Il est bien connu que les plantes aromatiques et médicinales sont très riches en composés bioactifs naturels et ont été utilisées par l'homme dans la médecine traditionnelle depuis les temps anciens pour traiter de nombreuses maladies. Le *T. vulgaris* est l'une de ces plantes très répandues en Algérie. Les huiles essentielles (HES) ainsi que les composés phénoliques sont les principaux métabolites secondaires constitutifs de la plante et ayant démontré des propriétés antioxydantes et antibactériennes contre la plupart des micro-organismes.

Par ailleurs, le lait fermenté (type yaourt) compte parmi les principaux dérivés de lait très largement produit dans le pays. Il se distingue surtout par son goût, sa texture, sa qualité rhéologique particuliers et surtout sa haute valeur nutritionnelle très recherchés par les consommateurs.

Toutes les études menées à ce jour ont dévoilé que le yaourt est extrêmement pauvre en composés phénoliques (**Rezac et al., 2018**). Le yaourt enrichi en antioxydants de sources naturelles semble donc être un format alimentaire pratique pour concevoir un produit santé pouvant associer les bienfaits des composés phénoliques (PPs) de la plante ainsi que celles des cultures starters du yaourt en vue de satisfaire les besoins sans cesse croissants des consommateurs.

L'efficacité des extraits phénoliques de *T. vulgaris* dans l'inhibition d'une gamme de bactéries pathogènes et/ou de bactéries liées à la détérioration des aliments dans les systèmes in vitro a déjà été rapportée par plusieurs auteurs (**Ballester-Costa et al., 2013 ; Kohiyama et al., 2015**). Cependant, il n'existe à ce jour, à notre connaissance, aucune étude permettant de vérifier les effets inhibiteurs des extraits phénoliques de cette plante sur les souches spécifiques du yaourt.

Ces effets antimicrobiens nous ont conduit à poser la question suivante : « Est ce que l'utilisation d'extraits bioactifs de *T. vulgaris* comme adjuvants dans le yaourt peuvent avoir un

effet sur la croissance de *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* qui présentent des intérêts variés (industriel et nutritionnel) » ?

Pour cela, nous nous sommes proposés d'essayer de connaître le comportement *in vitro* de ces deux bactéries lactiques du yaourt vis-à-vis à certains inhibiteurs de croissance tels les polyphénols, les flavonoïdes et bien d'autres composés bioactifs contenues dans le *T. vulgaris* poussant à l'état sauvage dans la région de Naâma et très largement utilisée en médecine traditionnelle. Des essais de supplémentation du yaourt en polyphénols extraits de *T. vulgaris* ont été ensuite suggérés en vue d'élaborer un nouveau produit alimentaire riche en composés phénoliques et de suivre la stabilité de sa qualité durant 21 jours de conservation au froid positif de 6°C.

Les objectifs escomptés à travers cette étude expérimentale s'articulent autour de cinq points essentiels :

- 1- Caractérisation phytochimique des principaux composés bioactifs de la plante autochtone sauvage de *T. vulgaris* (Thym) prélevée de la région de Naâma.
- 2- Extraction des polyphénols de la plante par usage de solvants à polarité croissante dont : Hexane, Ethanol, Méthanol, et Eau.
- 3- Caractérisation par HPLC du profil en composés phénoliques de *T. vulgaris*.
- 4- Détermination de l'activité antibactérienne des différents extraits phénoliques de *T. vulgaris* obtenus par usage de solvants à polarité croissante (hexane, éthanol, méthanol et eau) vis-à-vis des germes *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* en vue d'une optimisation de leurs utilisations dans la fabrication d'un lait fermenté type yaourt étuvé.
- 5- Essais d'incorporation des extraits de *T. vulgaris* dans la fabrication d'un lait fermenté (type yaourt étuvé) en vue de suivre sa stabilité physicochimique, microbiologique et organoleptique durant 4 heures de fermentation et 21 jours de post-acidification.

2. Intérêt de l'étude

Les polyphénols (PPs) sont des micronutriments phytoactifs synthétisés par les plantes et font partie de leurs métabolites secondaires, qui, dans la plupart des cas, sont utilisés dans les mécanismes de défense pour contrer les effets délétères des espèces réactives de l'oxygène (ROS). La grande capacité antioxydante des composés phénoliques peut avoir un effet positif sur la santé humaine en réduisant les risques de certains troubles tels que le cancer, le diabète et les maladies cardiovasculaires. C'est pourquoi il est fortement recommandé d'augmenter l'apport en agents antioxydants, surtout ceux qui ont des origines naturelles.

Appartenant à la famille des Lamiaceae, le thym (*T. vulgaris*) est considéré parmi les plantes les plus riches en composés phénoliques. Il est connu comme l'une des espèces la plus utilisée en industries alimentaires, cosmétiques et pharmaceutiques. En raison de sa teneur élevée en PPs, les extraits de thym peuvent offrir une alternative aux antioxydants synthétiques ajoutés souvent comme additifs alimentaires et peuvent attribuer plusieurs propriétés fonctionnelles aux produits alimentaires enrichis.

Par ailleurs, il est bien connu que le yaourt est un produit laitier fermenté, produit par deux bactéries spécifiques dont *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*. Il est depuis longtemps connu comme étant un bon support en ces deux souches probiotiques à effet santé pour les consommateurs ; mais dont les apports en PPs sont extrêmement limités (**Rezac et al., 2018**).

Cette étude contribue donc à une meilleure connaissance de l'effet des PPs de *T. vulgaris* sur les deux germes lactiques *t* et *Lb.bulgaricus* et ses conséquences sur la qualité d'un lait fermenté type yaourt étuvé enrichi d'extraits de la plante.

3. Matériels

Ce travail est le fruit de trois années de laboratoire ayant débuté le mois de Mars 2017 et achevé le mois de Avril 2020. L'expérimentation a été réalisée au niveau du laboratoire de Technologie Alimentaire et Nutrition (TAN) relevant de la faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université Abdelhamid Ibn Badis, Mostaganem.

3.1 Matière végétal

Les feuilles de *T. vulgaris* ont été collectées aléatoirement en mois de mars 2017 de la région de Mecheria, relevant de la wilaya de Naâma. Le site d'échantillonnage est situé sur les coordonnées GPS 33° 34' 28.85" N et 0° 17' 30.40" W (**Figure 11**). L'espèce végétale a été identifiée et authentifiée au département d'agronomie de l'université de Mostaganem. Les feuilles collectées de *T. vulgaris* ont été séchées pendant deux semaines à température ambiante (**Catier et Roux, 2007**). Après séchage, les feuilles ont été broyées et conservées dans des bocaux en verre hermétiquement fermés à 4 °C.



Figure 11. Zone de prélèvement du matériel végétal (Données cartographique, Google Maps, 2020).

3.2. Cultures starters de yaourt

Les cultures commerciales de yaourt lyophilisé YCX16 et CHN-11, constituées de *St.thermophilus* et de *Lb.bulgaricus*, ont été fournies par CHR HANSEN Co (Danemark).

3.3. Produits chimiques et appareillages

Les produits chimiques de marque Conda, Fluka et Sigma-Aldrich ont été utilisés lors de l'étude expérimentale. Les standards des acides chlorogéniques, kaempférol, narengénine, quercétine, caféine, catéchine, epicatéchine, trigonelline, théobromine, et l'acide phosphorique 85% ainsi que le méthanol $\geq 99.6\%$, ont été exploités lors du screening par HPLC des principaux composés phénoliques de la plante étudiée (*T. vulgaris*).

Le réactif Folin-Ciocalteu (2 N), le carbonate de sodium anhydre, l'hydroxyde de sodium, le trichlorure d'aluminium et l'eau ultra pure ont été employés pour la détermination de la teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes. L'hexane, l'éthanol et le méthanol aqueux (80/20, v/v ; solvant/eau) ont été utilisés pour l'extraction des polyphénols.

Le bouillon M-17, le bouillon MRS, la gélose M17 et la gélose Mueller-Hinton utilisés dans l'étude expérimentale proviennent des laboratoires Conda (Madrid, Espagne).

L'extraction des composés bioactifs a été opérée dans des erlenmeyer sous agitation (KMO 2 basic, IKA-WERKE, Allemagne). Lors du dosage des phénols totaux, l'absorbance a été mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de marque Shimadzu UV-VIS mini-1240V (Japon).

Le profil en polyphénols de la plante, a été déterminé par utilisation de LC-20AT, prominence liquid chromatograph, SHIMADZU (Japon) équipé d'une colonne type Pathfinder 100AS C18 (d'une longueur de 50 mm et d'un diamètre interne de 4,6 mm).

4. Méthodologie

4.1. Extraction des composés phénoliques de *T. vulgaris*

L'extraction des composés phénoliques a été réalisée selon la méthode décrite par **Sultana et al (2009)**. Les échantillons de la poudre séchée des feuilles de *T. vulgaris* (10g) ont été mélangés avec une solution aux solvants aqueux (hexane, éthanol ou méthanol) (100 ml) (solvant : eau, 80 :20 v / v) pendant six heures à température ambiante sous agitation (KMO 2 basic, IKA-WERKE, agitateur magnétique, Allemagne). Les extraits aux solvants aqueux de la plante ont été séparés des composants solides par filtration sur papier filtre Whatman grade 1 (Taille : 11 μ m), puis concentré et débarrassé des solvants sous vide en utilisant un évaporateur

rotatif (Heidolph, laborota 4001 efficient, Allemagne). Les procédures d'extraction ont été suivies à deux reprises et combinés. Les extraits bruts ont été séchés, conditionnés et conservés au froid (- 4°C) jusqu'à leurs utilisations ultérieures (**Figure 12**).

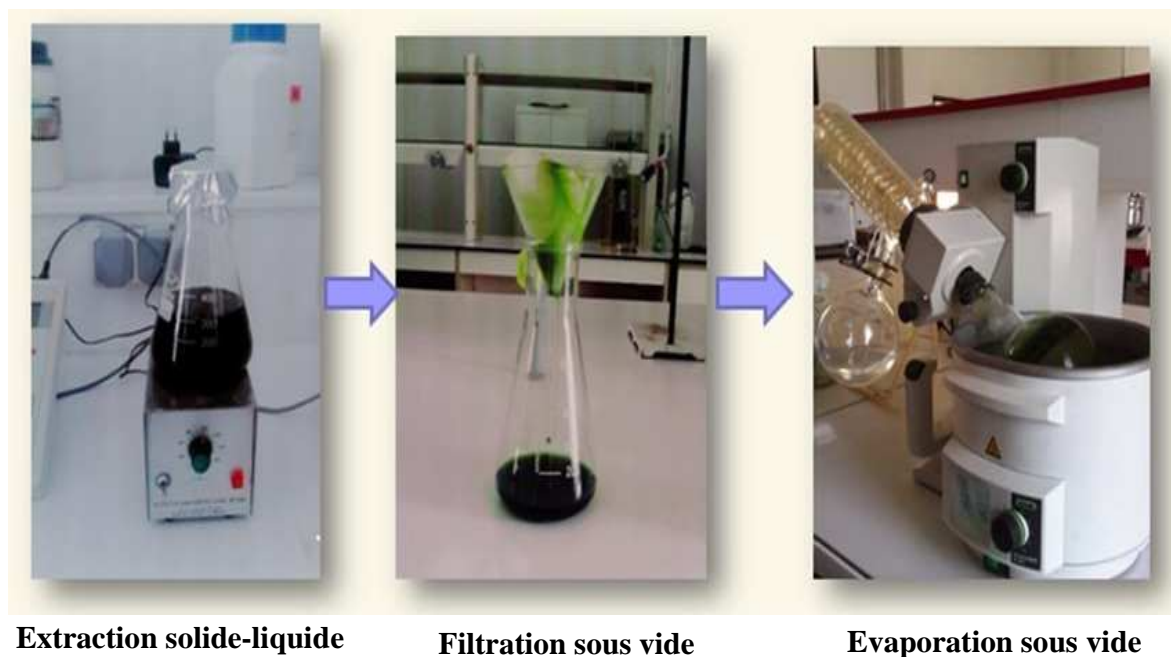


Figure 12. Procédé d'extraction des polyphénols de *T. vulgaris*

4.2. Etude phytochimique de *T. vulgaris*

4.2.1. Alcaloïdes

A 500 mg d'extrait hydroalcoolique sec sont ajoutés 10 mL de HCl 2N aqueux. Le mélange est ensuite porté au bain marie bouillant pendant 5 mn tout en agitant avec une baguette de verre. Après refroidissement, on y ajoute 500mg de NaCl. Le mélange est alors agité puis filtré sur papier Whatman. Le volume du filtrat est ensuite ramené à 10ml par addition d'HCl 2N puis réparti dans quatre tubes à essai dont l'un servira de témoin et les trois autres sont testés respectivement par addition de 5 gouttes de réactif d'alcaloïde (**Ranarivelo, 2004**). La réalisation de trois tests au minimum est nécessaire pour pouvoir affirmer la présence d'alcaloïdes dans le matériel végétal testé et éviter des réactions faussement positives (**Bruneton, 1999 ; Luhata et al., 2008**).

- ✚ **Test au réactif de Mayer:** la présence d'alcaloïde est indiquée par l'apparition de flocon de précipité blanc lors de l'addition de tétraiodomercurate de potassium (solution mélange de HgCl₂ et de KI) dans l'extrait acide.
- ✚ **Test au réactif de Wagner:** la présence d'alcaloïde se révèle à l'apparition de précipité rouge orangé lors de l'addition de réactif iodo-ioduré (solution mélange de I₂ et de KI) dans l'extrait analysé.
- ✚ **Test au réactif de Dragendorff:** la présence d'alcaloïde est révélée par l'apparition de précipité orange lors de l'addition de tétraiodobismuthate de potassium (solution mélange de sous-nitrate de bismuth et de KI) dans l'extrait testé.

4.2.2. Flavonoïdes

200 mg d'extrait organique sont dissouts dans 10 ml d'éthanol à 80%. Après filtration, 1ml de cette solution hydroéthanolique est additionné de 0,5 ml d'HCl concentré et de quelques grains de tournures de magnésium. Après 10 min, l'apparition d'une coloration rouge indique la présence de flavonoïdes (**Ranarivelo, 2004**).

4.2.3. Détection d'anthocyanes

A 2 ml de solution éthanolique d'extrait est ajouté 2 ml de solution d'acide chlorhydrique à 25%. L'apparition d'une coloration rose-rouge qui vire au bleu violacé par addition de solution d'ammoniaque à 25% indique la présence d'anthocyanes (**Gurib-Fakim et Gueho, 1997**).

4.2.4. Détection des leucoanthocyanes

A 2 ml de solution organique d'extrait sont additionnés 2 ml d'HCl concentré. Le mélange est placé au bain marie bouillant pendant une vingtaine de minutes. L'apparition d'une coloration rouge démontre la présence de leucoanthocyanes (**Gurib-Fakim et Gueho, 1997**).

4.2.5. Tanins et autres composés phénoliques

L'extrait organique de masse 100mg est dissout dans 25ml d'eau distillée bouillante puis additionné de quatre gouttes de solution aqueuse de NaCl à 10%. La solution ainsi obtenue est filtrée sur papier Whatman. Le filtrat refroidi est alors réparti dans quatre tubes à essai, le 4^{ème} tube sert de témoin (**Ranarivelo, 2004 ; Rizk et al., 1990**).

- ✚ **Tube n°1** : addition de cinq gouttes de gélatine à 1%. L'apparition d'un précipité éventuel indique la présence de polyphénols.
- ✚ **Tube n°2** : addition de cinq gouttes de gélatine salée (mélange volume à volume de gélatine à 1% et de solution NaCl à 10%). L'apparition d'une précipitation par la Gélatine salée signifie la présence de tanins.
- ✚ **Tube n°3** : addition de cinq gouttes de FeCl₃ dilué à 1% dans le méthanol :

* La présence de tanins galliques et ellagiques (tanins hydrolysables) est indiquée par l'apparition d'une coloration bleue noire ;

* La présence de tanins catéchiques (tanins condensés) s'observe par l'apparition d'une coloration brune verdâtre ;

* Une réaction négative à la gélatine salée accompagnée d'une coloration verte ou bleue noire avec FeCl₃, est due à la présence d'autres types de composés phénoliques.

4.2.6. Coumarines

Le test de détection des coumarines est basé sur leur propriété à présenter une fluorescence nette aux rayons UV. A 200 mg d'extrait, on ajoute 10 ml d'eau distillée. Après dissolution et filtration, à 5 ml du filtrat est additionnée goutte à goutte une solution aqueuse de soude à 20 %, puis on la chauffe au bain marie bouillant pendant quelques minutes. Le mélange est ensuite observé sous rayonnement UV à 365 nm : une fluorescence nette (jaune, vert, bleu, orange) sous UV indique la présence des coumarines (méthode indicative et non pas d'identification) (**Rizk et al., 1990 ; Bruneton, 1999**).

4.2.7. Triterpènes et stéroïdes

Prendre 500mg d'extrait organique et y ajouter 20 ml de dichlorométhane puis agiter pendant 5 à 10 min. Laisser décanter puis sécher la solution avec Na₂SO₄ anhydre. Filtrer et répartir le filtrat dans 5 tubes à essais propres et secs ; le tube n°5 servira de témoin (**Ranarivelo, 2004 ; Bolivar et al., 2011**).

✚ **Test de Liebermann Burchard:** Dans le 1er tube, additionner 4 gouttes d'anhydride acétique et 4 gouttes d'acide sulfurique concentré. La présence des composés chimiques est indiquée par la coloration observée suivante :

a) Pourpre : présence de triterpènes ;

b) Violet ou bleu-vert : présence de stéroïdes.

✚ **Test de Salkowski:** Incliner le tube à 45° puis ajouter 1ml d'acide sulfurique concentré. Après 30mn, la présence de stérols insaturés est indiquée par l'apparition d'un anneau de séparation des phases de couleur rouge.

✚ **Test de Badjet-Kedde:** Additionner quelques grains d'acide picrique à la solution. L'observation d'une coloration rouge dénote la présence de stéroïdes lactoniques.

✚ **Test de Keller Killiani:** Incliner le tube de 45° et additionner quelques gouttes de FeCl₃ à 10% dans le méthanol et quelques gouttes d'acide acétique glacial. La présence d'un anneau de séparation de phase de couleur rouge pourpre indique la présence de désoxyoses.

4.2.8. Quinones

200 mg d'extrait organique sont dissous dans de l'eau distillée, puis filtrés. Le filtrat est extrait deux fois au benzène. A 10 ml d'extrait benzénique sont ajoutées 5 ml de solution aqueuse d'ammoniaque NH₄OH à 20 %, puis le mélange est agité. Après décantation, une coloration rouge orangé ou rouge violacée de la phase ammoniacale indique un test positif (Bruneton, 1999 ; Dohou et al., 2003 ; Alilou et al., 2014).

4.2.9. Saponines

Une masse de 2 g de matériel végétal sec ou son équivalent en extrait brut est agitée vigoureusement pendant 30 secondes avec 20ml d'eau distillée dans un tube à essai. Le tube est ensuite disposé verticalement. Après 10 mn de repos, une hauteur de la mousse persistante, supérieure ou égale à 3 cm, indique la présence de saponines (Ranarivelo, 2004).

4.2.10. Composés cyanogénétiques

Dans un tube à essai, humecter 2g de matériel végétal sec avec une quantité suffisante d'eau puis ajouter 1 ml de CHCl_3 . Insérer ensuite une bandelette de papier filtre Whatman imprégnée de solution fraîchement préparée de picrate de sodium (5g de Na_2CO_3 + 0,5g d'acide picrique + 100mL d'eau distillée) juste au-dessus de la drogue et plier sur le bord du tube à essai. Boucher le tube avec du coton hydrophile et chauffer à 35°C au bain marie pendant 3 heures. La présence des composés cyanogénétiques est indiqué par le virage de la coloration du papier picrossodé au rouge orangé par production de HCN (Dohou et al., 2003 ; Alilou et al., 2014).

4.3. Détermination des Composés phénoliques Totaux (CPT)

La méthode du réactif Folin-Ciocalteu a été utilisée pour mesurer la teneur en polyphénols totaux (CPT) (Chaovanalikit et Wrolstad, 2004). Les extraits phénoliques bruts récupérés (50 mg) ont été mélangés avec du réactif Folin-Ciocalteu (0,5 ml) et de l'eau distillée (7,5 ml). Le mélange est maintenu à température ambiante pendant 10 minutes puis 1,5 ml du carbonate de sodium à 20% sont ajoutés. Le mélange a été chauffé dans un bain marie à 40 ° C pendant 20 minutes, puis refroidi dans un bain de glace. La teneur en CPT de thym est calculée suite au dosage du mélange après refroidissement au spectrophotomètre (UV mini-1240V, Shimadzu, Japon) réglé à une longueur d'onde de 730 nm et ce en se référant à une courbe d'étalonnage réalisée avec de l'acide gallique. Tous les analysés ont été réalisés en triple répétitions et les résultats ont été exprimés en microgramme équivalent acide gallique par millilitre d'extrait (μg EAG/ml d'extrait).

4.4. Détermination de la teneur en flavonoïdes

La méthode du trichlorure d'aluminium décrite par Pękal et Pyrzynska (2014) a été utilisée pour déterminer la teneur totale en flavonoïdes des extraits de *T. vulgaris*. 1 ml de l'échantillon (préparé dans du solvant avec les dilutions appropriées) est ajouté à 1 ml de solution d' AlCl_3 (2% dans du méthanol), le mélange est agité vigoureusement. Après 10 minutes d'incubation à température ambiante, l'absorbance a été lue à 430 nm. Une courbe d'étalonnage ($y = ax + b$) établie par la quercétine (0-40 $\mu\text{g}/\text{ml}$), réalisée dans les mêmes conditions a été utilisée pour la quantification des flavonoïdes. Les analyses ont été effectuées en triple

répétitions. La teneur en flavonoïdes a été exprimée en microgrammes équivalent quercétine par millilitre d'extrait végétal ($\mu\text{g EQ/ml}$ d'extrait).

4.5. Profil chromatographique des extraits phénoliques de *T. vulgaris*

La détermination du profil phénolique des extraits hydroalcooliques de *T. vulgaris* a été réalisée par chromatographie liquide prominence-LC-20AT Shimadzu (Japon) selon la méthode décrite par **Jerez et al (2006)**. Les deux solvants utilisés pour faire le gradient ont été (A) du méthanol à 100 % et (B) de l'acide phosphorique à 2mM 85%. Le gradient de solvant dans les rapports volumétriques A et B était le suivant : 0-35 min, 5A / 95B ; 35-40 min, 75A / 25B ; 40-45 min, 100A / 0B ; 45-55 min. La détection a été effectuée à 254 nm comme longueur d'onde préférée. La séparation a été effectuée sur une colonne Pathfinder 100AS C18 de 4,6 mm \times 50 mm (taille des particules de 2,5 μm). Les paramètres de fonctionnement de l'HPLC étaient les suivants : volume d'injection, 20 μL ; débit de la colonne, 1mL/min ; température chromatographique, 30°C. Trois répétitions ont été effectuées sur chaque extrait obtenu. Des étalons d'acides chlorogéniques (Acide 3-O-Caffeoylquinique, Acide 4-O-Caffeoylquinique, Acide 5-O-Caffeoylquinique, Acide 5-O-Feruloylquinique, Acide 3,4-O-Dcaffeoylquinique, Acide 3,5-O-Dcaffeoylquinique, Acide 4,5-O-Dcaffeoylquinique), de quercétine, de catéchine, d'épicatéchine, de Kaempférol, de Narengénine, de Trigonelline, de Théobromine et de caféine ont été utilisés. L'identification de chaque pic a été effectuée en comparaison avec les standards et les temps de rétention.

4.6. Etude des effets antimicrobiens des extraits de thym

4.6.1 Activation des inocula microbiens

L'activation a concerné les deux bactéries pures de références et spécifiques du yaourt à savoir *St.thermophilus* (ATCC® 19258™) et *Lb.bulgaricus* (ATCC® 11842™). Une prise de 0.25 g de la souche lyophilisée donnée conservée au froid à 4 °C a été au préalable réchauffée à la température ambiante avant son ensemencement dans 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C pendant 03 heures. 0,1 ml de cette dernière solution constituant l'inoculum microbien a été ensemencé ensuite en surface d'une boîte de Pétri contenant un milieu spécifique gélosé de croissance pour chaque espèce microbienne (MRS ou M17) et incubé à 37°C pendant 24 heures.

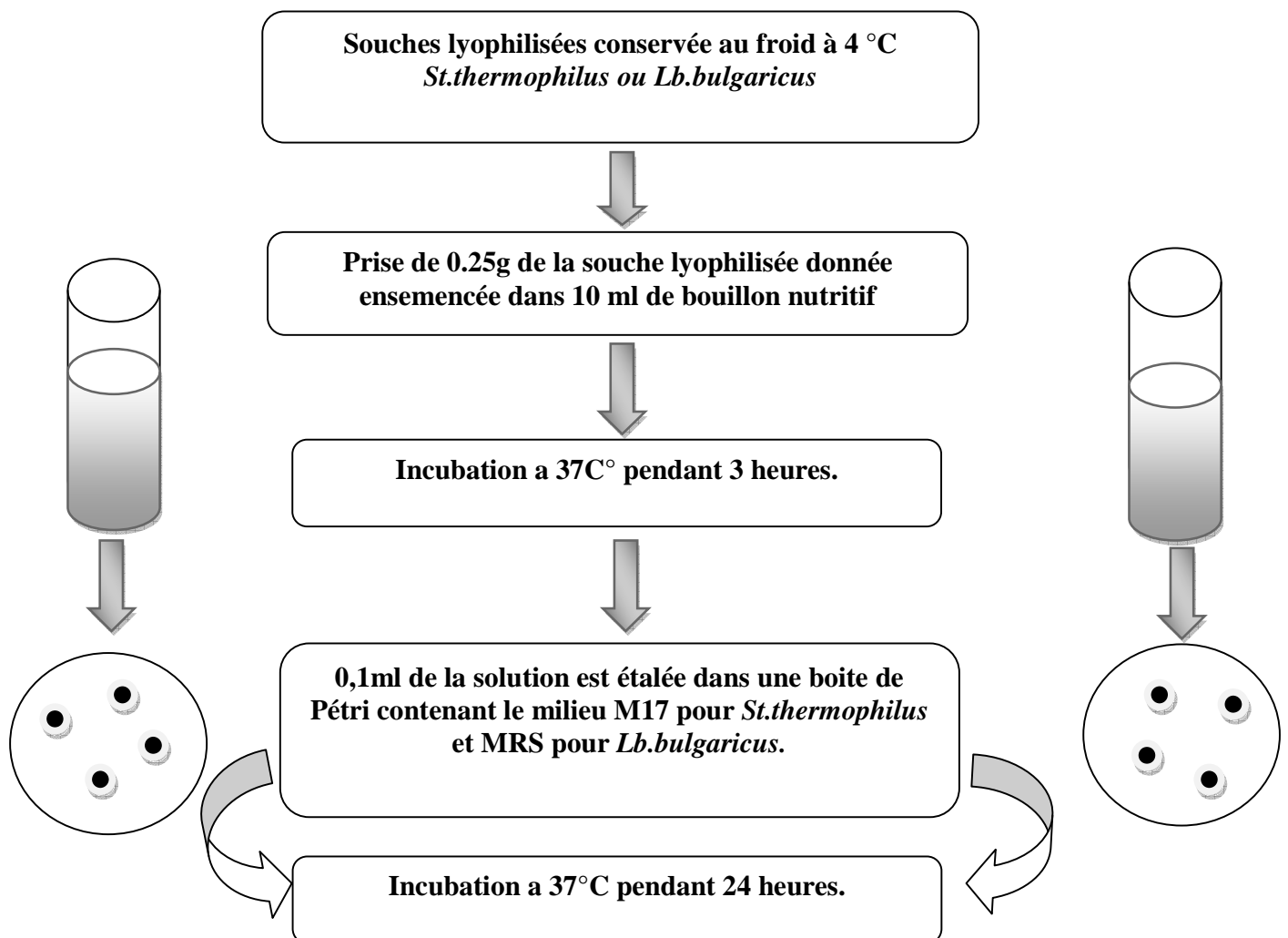








Figure 13. Méthode d'activation des cultures starter de yaourt

4.6.2 Méthode de contact direct

Une colonie issue d'une culture jeune de chaque espèce microbienne activée comme préalablement sur milieu solide gélosé spécifique a été prélevée à l'aide d'une anse à platine stérile, chacune a été ensuite ensemencée dans un tube contenant 10 ml de bouillon nutritif, suivi d'une incubation à 37°C durant 03 heures (DO=0,9). A partir de ces dernières solutions dont chacune constitue l'inoculum microbien d'une espèce de bactérie lactique donnée, des dilutions décimales isotopiques croissantes dans l'eau physiologique ont été effectuées ; allant à 10^{-4} pour respectivement *St.thermophilus* et les *Lb.bulgaricus*. Des prélèvements de 01 ml de chaque dernière dilution décimale ont été ensuite individuellement ajoutés à 09 ml de chaque extrait de thym dilué à l'eau distillée et concentrée respectivement, à raison de 0, 20, 40, 60, 80 et 100%

(**Tableau 2**). Les mélanges des solutions ont été enfin ensemencés en triple essais (03 boîtes de Pétri) chacune en surface à raison de 0.1 ml sur le milieu spécifique de croissance pour chaque espèce microbienne (MRS ou M17). La lecture du nombre de colonies développées a été effectuée après incubation des milieux ensemencés à 42°C pendant 24 heures (**Bourgeois et Leveau, 1980**).

Tableau 2. Préparation des concentrations des extraits de *T. vulgaris*.

Concentrations des solutions(%)	00	20	40	60	80	100
Extrait phénolique De <i>T. vulgaris</i> (ml)	00	02	04	06	08	10
Eau distillée (ml)	10	08	06	04	02	00
Extraits phénoliques+ Eau distillé						

4.6.3. Méthode des disques par diffusion sur gélose

Les disques ont été confectionnés à partir de papier filtre (Whatman n° 3), à raison de 6mm de diamètre. Pour éviter tous risques de contamination aux germes exogènes au cours de l'expérimentation les disques ont été stérilisés à 120°C pendant 15 minutes dans un autoclave.

Une colonie de chaque espèce lactique prélevée du milieu gélosé spécifique après activation a été ensemencée dans 10 ml de bouillon nutritif (DO=0,9) ; chaque mélange constitue l'inoculum microbien donné. Des prises de volume de 0,1ml de chaque inoculum ont été étalées séparément en surface de plusieurs boîtes de Pétri contenant le milieu MRS ou M17 selon l'espèce microbienne étudiée. Trois disques imbibés pendant 5 minutes dans chaque dilution d'extrait obtenu selon le solvant utilisé, ainsi que dans une solution contenant un puissant antibiotique dont la Pénicilline (la charge de disque est de 6 µg ou 10 IU), ont été ensuite déposés successivement à la surface de chaque boîte de Pétri contenant le milieu gélosé spécifique ensemencé au germe lactique approprié (**Prescott et al., 2003**). La lecture des diamètres d'inhibition a été effectuée après incubation des boîtes de Pétri à 42°C pendant 24 heures à l'aide d'un pied à colis (**Guignard, 2000**).

4.6.4. Concentration minimale inhibitrice (CMI)

La concentration minimale inhibitrice est la plus petite concentration en antibiotique, en antifongique et /ou en principes composés actifs nécessaires pour inhiber la croissance d'un microorganisme (Denis et al., 2011).

Dans le cas de notre étude, c'est les principes actifs des extraits de la matière végétale du thym obtenus par extraction aux différents solvants qui sont utilisés pour déterminer la concentration minimale inhibitrice des espèces de germe spécifiques du yaourt (*St.thermophilus* ou *Lb.bulgaricus*). Ainsi, une colonie jeune de *St.thermophilus* ou de *Lb.bulgaricus* prélevée à l'aide d'une anse de platine dans 10 ml de bouillon nutritif a été incubée pendant 03 heures à 37°C en vue d'obtenir les inoculas (DO=0,9). Des prises de 0,2 ml de chaque inoculum ont été ensuite introduites respectivement dans 2 ml de chaque extrait végétal dilué non pas avec de l'eau mais avec le bouillon Mueller Hinton. Les mélanges des tubes contenant séparément chaque extrait préparé à différentes concentrations (0, 20, 40, 60, 80 et 100%) et l'inoculum de bactérie lactique ont été ensuite incubés à 42 °C pendant 18 à 24 heures (Moroh et al, 2008). La détermination de la concentration minimale inhibitrice CMI a été effectuée à partir de la mesure de la turbidité induite par la croissance du microorganisme étudié. La CMI correspond à la plus petite concentration pour laquelle il y a absence de turbidité. Par conséquent c'est le premier tube où la valeur d_i sera égale à df ($d_i - df$).

Le taux de survie du microorganisme a été mesuré au spectrophotomètre réglé à 560 nm et exprimé comme suit :

$$S = \frac{d_i - df}{Df - Di} \times 100$$

Avec :

- S : Taux de survie du microorganisme exprimé en %.
- $df-di$: Différence de densité optique dans la solution d'extrait phénoliqueensemencée au germe avant et après incubation à 42°C durant 18 heures.
- $Df-Di$: Différence de densité optique dans la solution d'eau distillée stérileensemencée au germe étudié avant et après incubation à 37°C durant 18 heures (Kra , 2001 ; Noël et al., 2007).

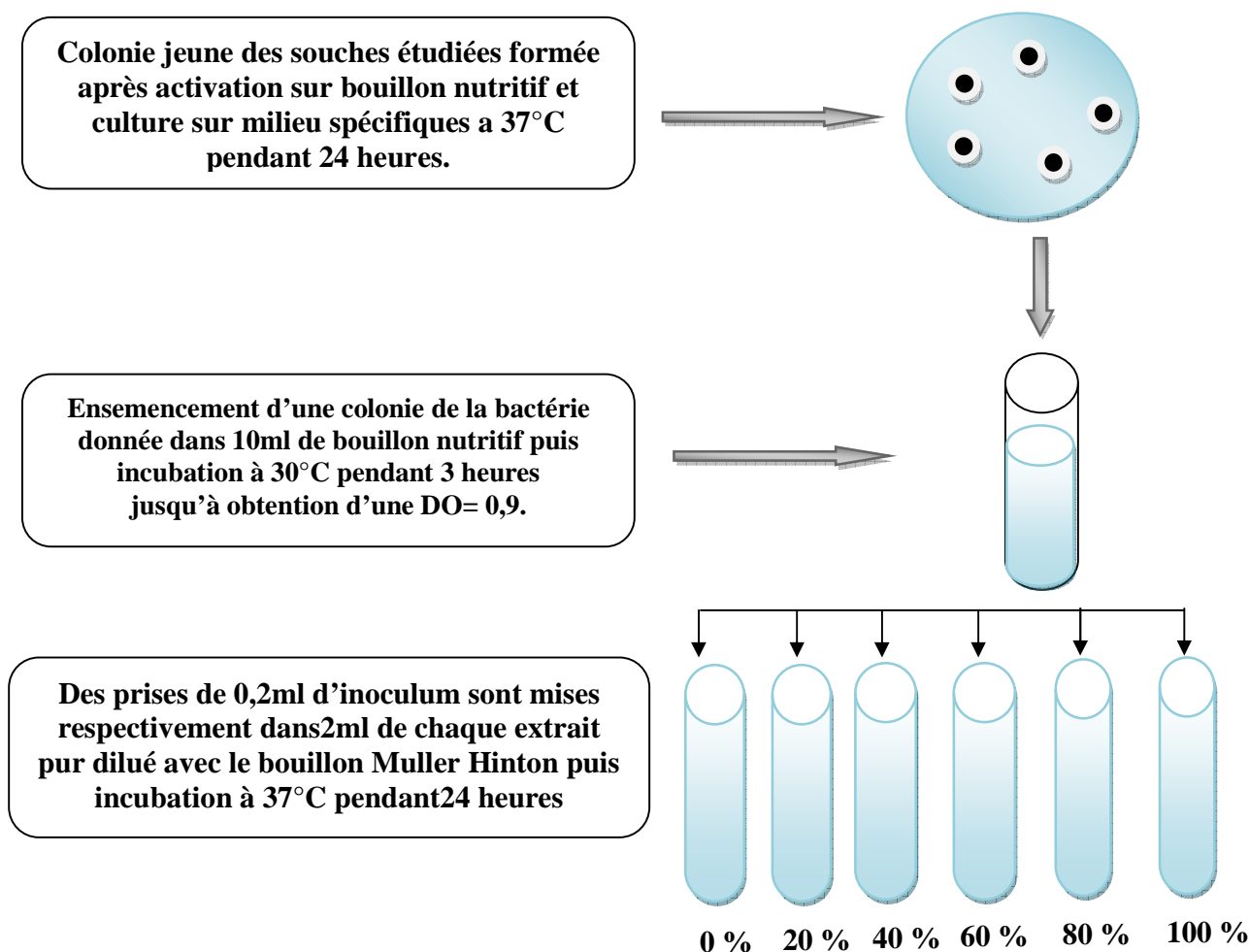


Figure 14. Méthode de détermination de la CMI des extraits de thym

4.6.5 Concentration minimale bactéricide (CMB)

La concentration minimale bactéricide représente la plus petite concentration d'extrait de la plante qui laisse 0,01% au moins de survivant de l'inoculum microbien initial après incubation (Moroh *et al.*, 2008).

Pour sa détermination, le tube témoin (inoculum) a été dilué à l'eau physiologique jusqu'à 10^{-4} . Cette dilution représente 0,01% de survie du microorganisme. Elle est ensemencée par strie de 5 cm sur une Gélose Mueller Hinton puis incubée à 37°C pendant 24 heures. Le nombre de colonies de bactéries obtenu sur la strie de la dilution 10^{-4} est comparé à celui de chaque tube expérimental d'extrait contenant l'inoculum, préparé comme préalablement, également ensemencé sur le même milieu de culture en strie de 5cm et incubé à 37 °C durant 18

à 24 heures. Ainsi, le premier tube expérimental dont le nombre de colonies présent sur sa strie est inférieur ou égal à celui de la dilution 10^{-4} correspond à la CMB.

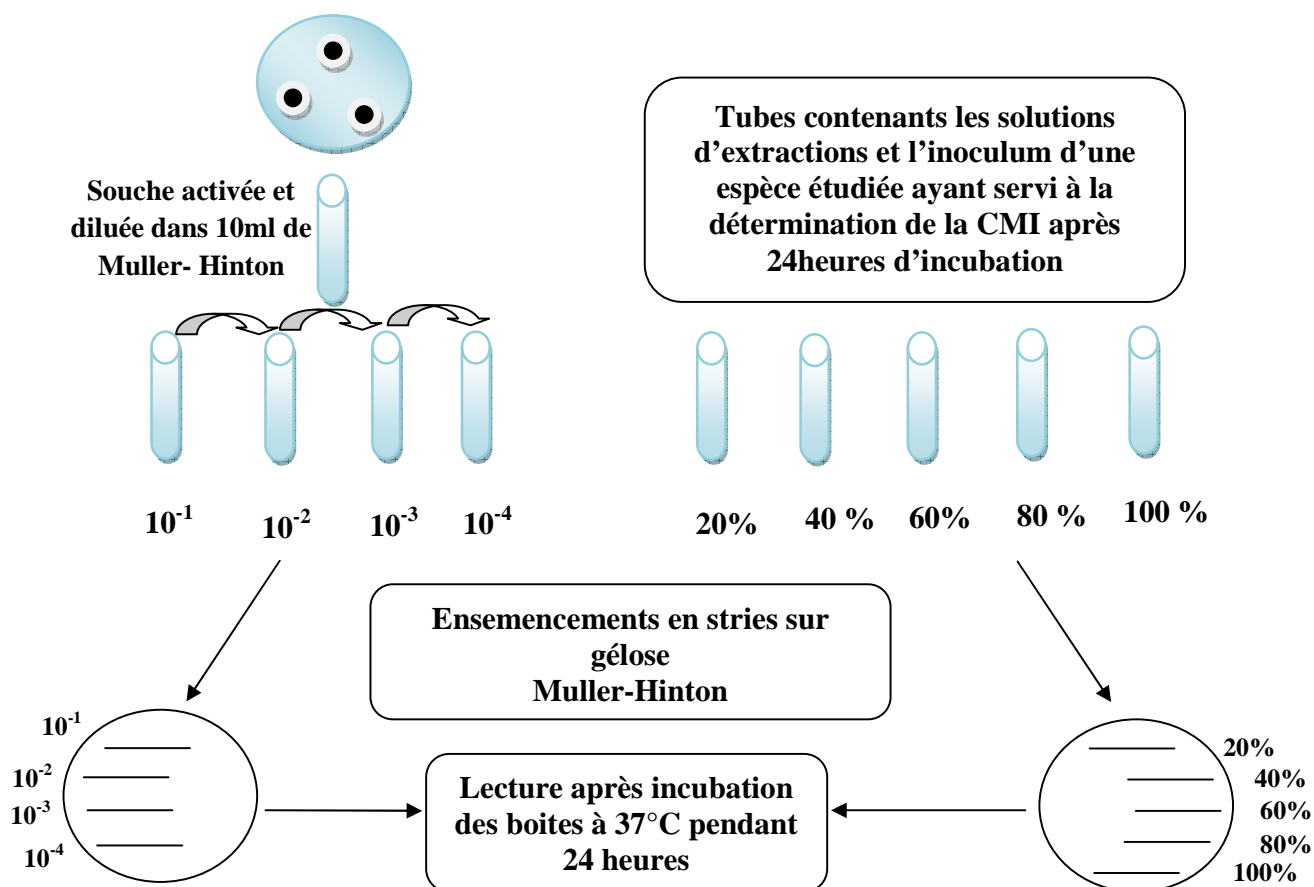


Figure 15. Méthode de détermination de la CMB de l'extrait de thym vis-vis au *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*.

4.7. Essais de production d'un yaourt étuvé enrichi d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*

4.7.1. Préparation des levains lactiques

Un litre de lait préparé à un taux de 130g/l de poudre de lait «écrémé», a subi une thermisation à l'ébullition durant 2 minutes suivi d'un refroidissement à 45°C . Le lait pasteurisé a été, ensuite, fractionné en deux échantillons de 500 et 250 ml, respectivement. Le premier échantillon de lait a étéensemencé avec 0,5 g d'une prise de la souche lactique lyophilisée pure de *St.thermophilus*. Le second échantillon a été à son tourensemencé avec 0,25 g de la souche pure de *Lb.bulgaricus*. Ces deux prises de lait après ensemencement aux deux germes

spécifiques du yaourt ont été mélangées ensemble dans un bécher et étuvés à 45°C pendant 1heure. Le levain prés a l'emploi avec un rapport des souches de 2 *St.thermophilus* pour 1 *Lb.bulgaricus* (2S/1L) a été enfin incorporé au cours de la fabrication des laits fermentés expérimentaux (type yaourt ferme) à un taux de 3%.

4.7.2. Production des yaourts étuvés enrichis en extraits phénoliques de *T. vulgaris*

Le lait de vache demi-écrémé pasteurisé qui a été utilisé dans la fabrication des laits fermentés expérimentaux type yaourt étuvé a été fourni à titre de don par le groupe industriel GIPLAIT sise à Mostaganem. Afin de tester l'impact d'ajout d'un extrait expérimental quelconque de *T. vulgaris* obtenu selon le solvant d'extraction utilisé sur la qualité du yaourt, le lait pasteurisé a été tout d'abord chauffé à 45°C et réparti en cinq lots de trois pots d'une capacité de 100 ml chacun. Les échantillons de chaque lot ont été ensuite respectivement incorporés à 0 (échantillons témoin), 2, 4, 6 et 8% v/v d'extrait de la plante testé. Les mélanges obtenus ont été inoculés à 3 % avec une culture bactérienne starter du yaourt (levain) préparée à un rapport de souches de 2*St*/1*Lb* (2 *St.thermophilus* / 1 *Lb.bulgaricus*). Pour démarrer la fermentation, les échantillons ont été maintenus à 45°C pendant quatre heures. Enfin, les yaourts additionnés d'extrait de composés phénoliques de *T. vulgaris* ont été refroidis rapidement à 4°C et stockés dans des conditions de réfrigération (6°C) pendant 21 jours. Aucun additif pouvant masquer les caractéristiques organoleptiques et rhéologiques n'a été ajouté aux produits transformés (ni saccharose, ni arôme, ni autres additifs quelconques) (**Figure 16**).

4.7.3. Analyses physicochimiques des yaourts expérimentaux

Les méthodes AOAC (2005) ont été utilisées pour déterminer les paramètres physico-chimiques (acidité, pH et viscosité apparente) des yaourts expérimentaux pendant les périodes de fermentation et de post-acidification.

4.7.3.1. Acidité titrable

L'acidité Dornic (°D) exprimée en degré Dornic (°D) a été déterminée en titrant 10 ml de yaourt liquide avec une solution de NaOH préparée à une normale 1/9 N en présence de phénolphtaléine comme indicateur coloré jusqu'à l'apparition d'une couleur rose persistante dans le milieu.

4.7.3.2. pH

La mesure du pH a été effectuée à l'aide d'un pH-mètre numérique de paillasse (Benjamin-140, Italie) calibré avec deux solutions ; acide et basique.

4.7.3.3. Viscosité

La viscosité apparente (kg/ms) a été établie à l'aide d'un tube en verre de 2 cm de diamètre et de 18 cm de longueur équipé d'un chronomètre et d'une bille standard. Le yaourt est défini comme un fluide viscoélastique. Il possède donc à la fois les propriétés visqueuses d'un liquide et les propriétés élastiques d'un solide. Le comportement rhéologique du yaourt est de type non Newtonien, dans ce sens où la viscosité du produit dépend de la vitesse de cisaillement ou de la contrainte exercée. La viscosité du yaourt a été déduite comme suit :

$$u = k \times (\rho_{\text{Bille}} - \rho_{\text{Yaourt}}) \times t$$

$$u = \frac{2r \times 2g}{9 \times (\rho_{\text{Bille}} - \rho_{\text{Yaourt}})}$$

$$k = \frac{2r \times 2g}{9 \times x}$$

Avec :

- u :** Viscosité dynamique ($\text{Kg.m}^{-1}\times\text{s}^{-1}$)
- k:** Constante= $8,175.10^{-4}\text{m}^{-2}$.
- r:** Rayon de la bille tel que, $r = D/2=7,7\text{mm}$.
- x :** La distance d'écoulement de la bille, $x= 16\text{cm}$.
- g :** La force de pesanteur, tel que $g= 9.8 \text{ m/s}^2$.
- ρ_{Bille} :** La masse volumique de la bille = $7861,27 \text{ Kg.m}^{-3}$.
- ρ_{Yaourt} :** La masse volumique de yaourt (Kg.m^{-3}).
- t:** Temps parcouru pour la bille entre deux points A et B.

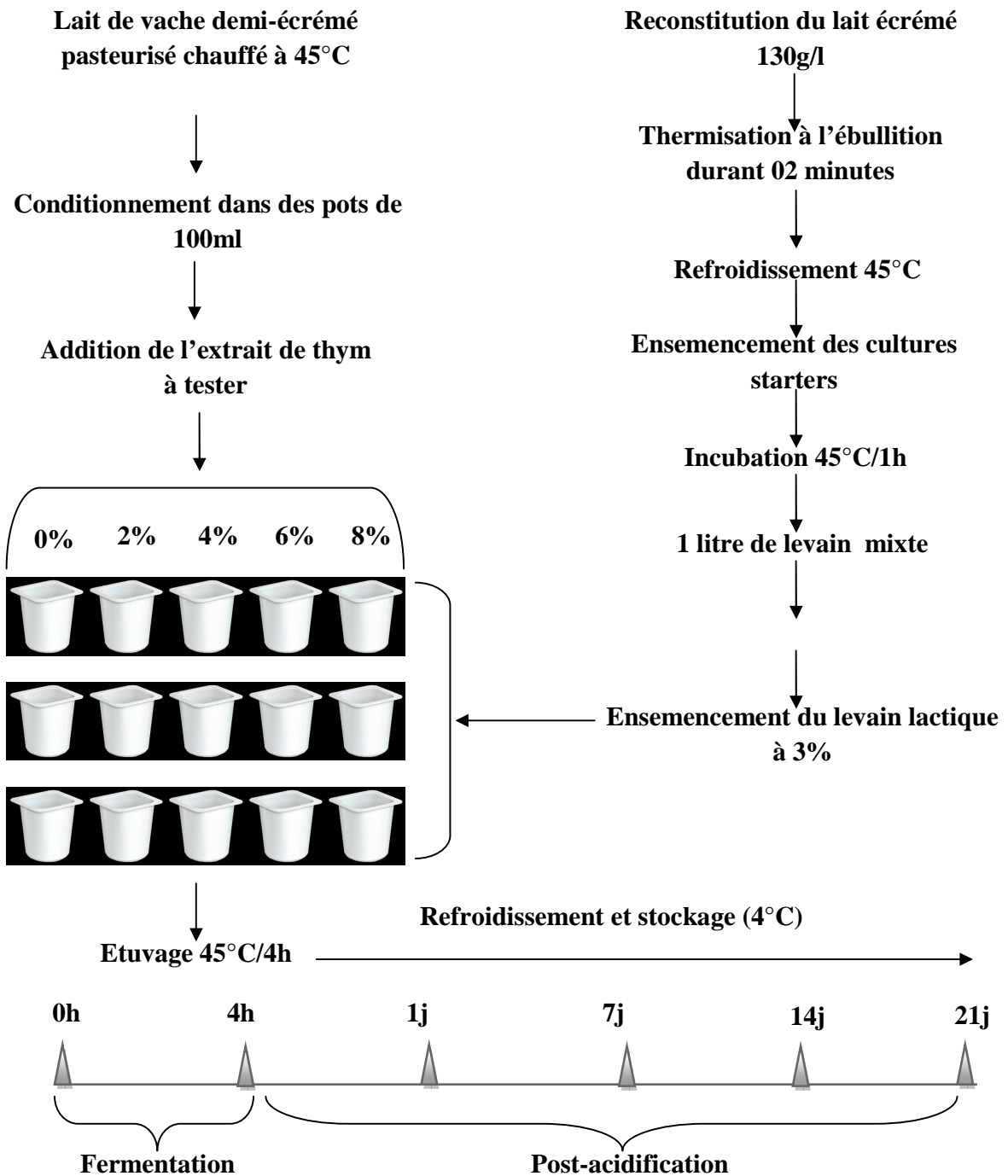


Figure16. Diagramme de fabrication des yaourts étuvés enrichis d'extrait teste de *T. vulgaris*

4.7.4. Dénombrement des cultures starter de yaourt

Les milieux de culture M17 et MRS ont été utilisés pour le dénombrement de *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* selon la méthode décrite par la Fédération internationale de lait (IDF, 2003).

Des dilutions décimales de l'échantillon d'essai ont été inoculées:

- Dans le Milieu MRS acidifié, suivi d'une incubation anaérobie à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 72 heures, pour le comptage de *Lb.bulgaricus* ;
- Et dans le Milieu M17, suivi d'une incubation aérobie à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 48 h, pour le dénombrement de *Streptococcus thermophilus*.

Les résultats ont été exprimés en UFC/mL (unités formant colonies par millilitre de yaourt).

4.7.5. Test organoleptique

Un jury de dégustation formé de dix panélistes relevant du département d'agronomie de l'université de Mostaganem a été constitué afin d'apprécier sur une échelle de notation de 10 points les propriétés sensorielles des yaourts incorporés d'extraits de thym et conservés au froid à 4°C pendant 21 jours dont: goût acide, goût de fraîcheur, cohésivité, adhésivité, odeur, arrière-goût et couleur.

5. Traitement statistique

Les résultats paramétriques ont été traités statistiquement par une analyse de variance bifactorielle (ANOVA) en randomisation totale suivie d'une comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman-Keuls. Par contre, les données organoleptiques ont été traitées à l'aide du test non paramétrique de Friedman. Tous les calculs ont été effectués avec le logiciel software Stat Box (version 7.0 ; Agro Solutions, France).

Partie 3

Résultats et discussion

Chapitre I

*Caractérisation des principaux composés phénoliques de *Thymus vulgaris**

1. Résultats

1.1. Teneur en eau

La teneur en eau de *T. vulgaris*, déterminée par la méthode pondérale, qui consiste à mesurer la perte de la masse d'eau par dessiccation à l'étuve à une température de 105 °C pendant 24 heures a montré que la plante fraîche renferme entre 60 et 80 % d'eau. Les échantillons de *T. vulgaris* objet de l'étude ont révélé un faible taux d'humidité de l'ordre de 9.4%.

1.2 Caractérisation phytochimique

L'analyse phytochimique a révélé la présence de nombreux composés bioactifs dont alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, triterpènes et saponines dans les différents extraits de l'hexane aqueux, hydrométhanolique et hydroéthanolique de *T.vulgaris*. Aucun de ces extraits du végétal testé n'a montré une présence d'anthocyanes, de leucoanthocyanes, de quinones et de composés cyanogénétiques. Par ailleurs, l'ensemble de ces groupes chimiques n'ont pas été identifiés dans l'extrait à l'hexane aqueux qui s'avère plutôt riche en triterpènes (**Tableau 3**).

Tableau 3. Screening phytochimique des extraits aux solvants de *T. vulgaris*

Groupes chimiques	Types d'extraits			
	Hexane-eau	Ethanol-eau	Méthanol-eau	Aqueux
Alcaloïdes	-	+	+	+
Flavonoïdes	-	++	+++	+
Anthocyanes	-	-	-	-
Leucoanthocyanes	-	-	-	-
Tanins	-	+	+	+
Coumarines	-	-	+	-
Triterpènes	+++	+	+	+
Quinones	-	-	-	-
Saponines	-	IM : 260	IM : 350	IM : 280
Composés cyanogénétiques	-	-	-	-

+++ : réaction franchement positive ; ++ : réaction positive ; + : réaction moyennement positive ; ± : réaction louche ; - : réaction négative ; IM : indice de mousse.

1.3. Teneur composés phénoliques totaux (CPT) et flavonoïdes des extraits de *T. vulgaris*

L'extrait hydrométhanolique a présenté la teneur en polyphénols la plus élevée (243,74 µg EAG/ml d'extrait), suivi de l'extrait hydroéthanolique (163,20 µg EAG/ml d'extrait), puis celui de l'eau (126,47 µg EAG/ml d'extrait) et à l'hexane aqueux (86,83 µg EAG/ml d'extrait).

La teneur totale en flavonoïdes des différents extraits expérimentaux de *T. vulgaris* a varié significativement ($p < 0,01$) de 05,12 à 42,21 µg EQ/ml d'extrait. L'extrait hydrométhanolique a accusé la plus grande quantité ($p < 0,01$) de flavonoïdes (42,21 µg EQ/ml d'extrait), suivi de l'extrait hydroéthanolique (37,83 µg EQ/ml d'extrait) et de l'extrait aqueux (29,55 µg EQ/ml d'extrait) ; alors que l'extrait à l'hexane a enregistré de très faibles ($p < 0,01$) concentrations (05,12 µg EQ/ml extrait) (**Tableau 4**).

Tableau 4. Teneur en polyphénols totaux et en flavonoïdes des différents extraits aux solvants à différentes polarités de *T. vulgaris*.

Type d'extrait	Composition	
	Polyphénols totaux µg EAG/ml d'extrait	Flavonoïdes µg EQ/ml d'extrait
Hexane-eau	^d 86,83 ± 1.11	^c 05,12 ± 1.55
Hydroéthanolique	^c 163,20 ± 0.57	^a 37,83 ± 0.43
Hydrométhanolique	^a 243,74 ± 0.61	^a 42,21 ± 0.32
Aqueux	^b 126,47 ± 0.92	^b 29,55 ± 0.68

Les données sont exprimées en valeurs moyennes plus ou moins écarts types correspondants, avec un nombre de répétitions n égal à 3 (n=3) ; a,b,c,d : groupes homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls.

1.4. Profil en polyphénols des extraits de *T. vulgaris*

Le **Tableau 5** illustre les profils en composés phénoliques obtenus par HPLC dans les divers extraits de *T. vulgaris*. Des chromatogrammes représentatifs de chaque extrait sont aussi représentés dans la **figure 17**.

Plusieurs acides phénoliques et composés flavonoïdes ont été identifiés dans l'extrait aqueux et dans les autres extraits obtenus avec les différents mélanges solvants-eau (80 :20 ; v/v) de *T. vulgaris* récoltée dans la région de Mecheria.

L'apigénine et la fisétine ont été considéré comme étant les composés bioactifs les plus dominants dans l'extrait hydrométhanolique de thym, puisqu'ils ont représenté 40 et 33 % respectivement du total des composés phénoliques totaux extraits, suivi par l'acide rosmarinique (7%), l'acide benzoïque (6%), la quercétine (3%) et l'hespéridine (2%).

L'acide gallique et l'acide rosmarinique ont été en particulier les deux composés phénoliques prédominants dans l'extrait aqueux ; avec des taux de 52 et 23 % des CPT, respectivement. Des taux relativement faibles d'acide chlorogénique (6%), de l'acide vanillique (5%) et de l'acide caféique (3%) ont été aussi trouvés dans cet extrait. Par ailleurs, la quercétine est le seul flavonoïde (8%) détecté dans l'extrait aqueux de l'espèce végétale étudiée.

Tableau 5. Profil en composés phénoliques des extraits aux solvants à différentes polarités de *T. vulgaris*.

Composés phénoliques	Solvants d'extraction			
	Hexane-eau (80 :20 ; v/v)	Ethanol-eau (80 :20 ; v/v)	Méthanol-eau (80 :20 ; v/v)	Eau 100%
	% CPT			
Acide gallique	^c 0	^b 24,92 ± 1,18	^c 0	^a 52,15± 2,16
Acide vanillique	^b 0	^b 0	^b 0	^a 5,82± 1,11
Acide chlorogénique	^b 0	^b 0	^b 0	^a 6,87± 1,21
Acide caféique	^b 0	^b 0	^b 0	^a 3,81± 0,51
Acide cinnamique	^b 0	^a 12,49±2.03	^b 0	^b 0
Hespéridine	^b 0	^b 0	^a 2,19± 0,01	^b 0
Rutine	^b 0	^a 16,13 ± 1,23	^b 0	^b 0
Acide rosmarinique	^d 0	^b 12,27 ± 0,45	^c 07,18± 0,01	^a 23,16± 1,02
Acide benzoïque	^b 0	^b 0	^a 6,24± 0,02	^b 0
Quercétine	^c 0	^a 11,59 ± 0,37	^b 3,24± 0,02	^a 8,19± 1,09
Fisétine	^b 0	^b 0	^a 33,82±0,02	^b 0
Apigénine	^c 0	^b 22,60±1,07	^a 40,46±0,04	^c 0
Thymol	^a 54,39±2,62	^b 0	^b 0	^b 0
Carvacrol	^a 22,73±1,03	^b 0	^b 0	^b 0
Phytol	^a 12,62±0,15	^b 0	^b 0	^b 0
Bornéol	^a 10,26±0,76	^b 0	^b 0	^b 0

Les données sont exprimées en valeurs moyennes plus ou moins écarts types correspondants, avec un nombre de répétitions n égal à 3 (n=3) ; CPT : composé phénolique totaux ; a,b,c,d : groupes homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman et Keuls.

Concernant l'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris*, il s'avère très riche ($p < 0,01$) en acide gallique (24% CPT) et en apigénine (22% CPT); alors qu'il renferme de faibles concentrations variables de 11 à 16 % en acide cinnamique, acide rosmarinique, de rutine et en quercétine.

En fin, Le thymol (54% CPT) et le carvacrol (22% CPT) ont été les principaux composés phénoliques identifiés dans l'extrait à l'hexane aqueux et à moindre taux le Phytol (12%) et le Bornéol (10%).

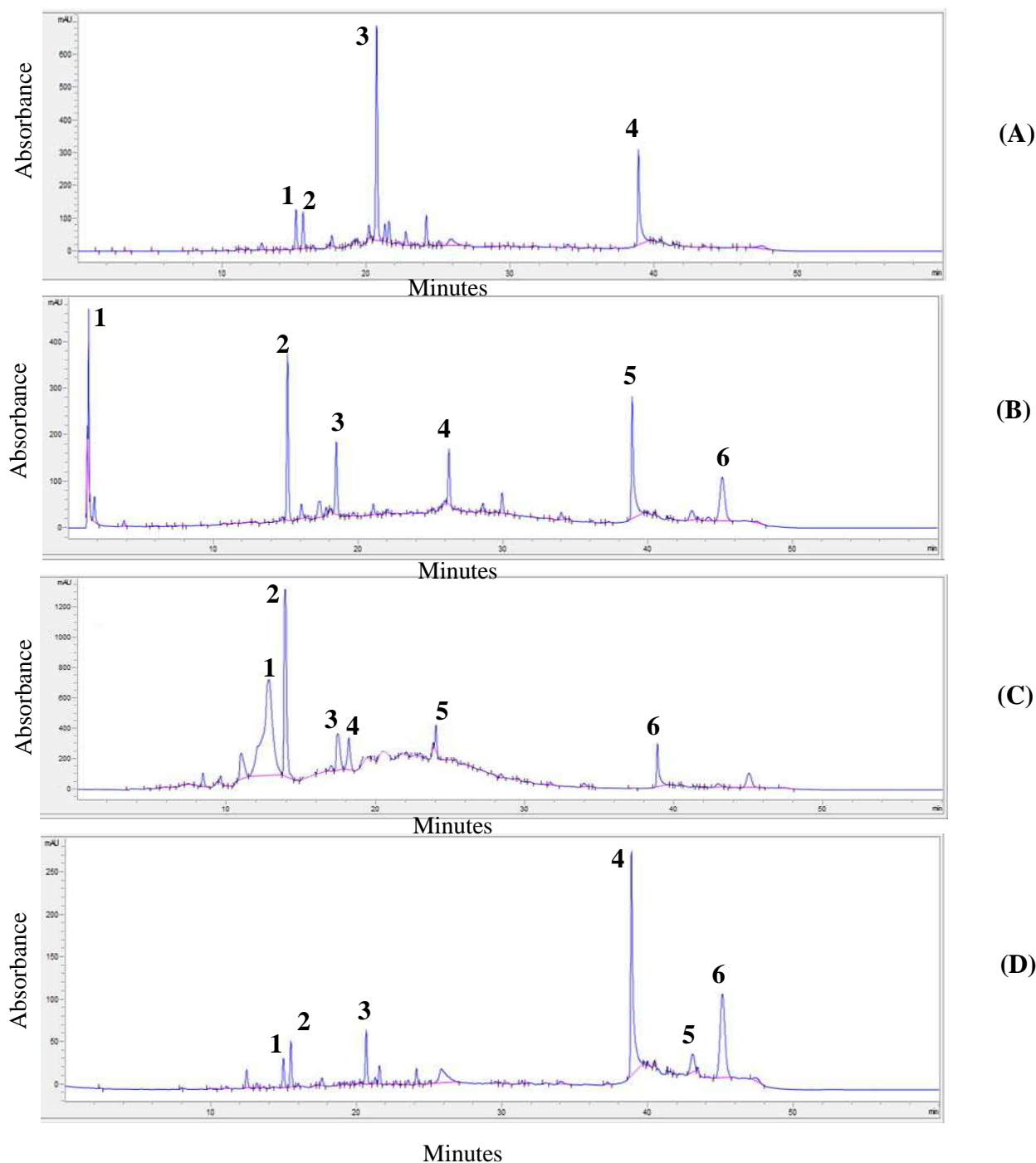


Figure 17. Chromatogrammes des principaux composés phénoliques des extraits aux solvants à différentes polarités de *T. vulgaris* A : Extrait à l'hexane aqueux (HX-A) ; B : Extrait à l'éthanol aqueux (EtOH-A) ; C : Extrait au méthanol aqueux (MeOH) ; D : Extrait Aqueux (A)

2. Discussion

Certains constituants chimiques des plantes médicinales sont bien connus pour être des métabolites secondaires biologiquement actifs et responsables de différentes activités antioxydantes, antimicrobiennes, antifongiques et anticancéreuses (**Hossain et al., 2013**).

Le screening phytochimique des extraits de *T. vulgaris* obtenu par usage de solvants à polarité croissante (Hexane, éthanol, méthanol et eau) a permis de caractériser les différents groupes chimiques biologiquement actifs contenus dans la plante objet de l'étude. En effet, les extraits de *T. vulgaris* ont montré une grande richesse des parties aérienne du végétal en composés alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, triterpènes et en saponines. Les autres composés bioactifs dont les anthocyanes, les leucoanthocyanes, les quinones et les composés cyanogénétiques n'ont pas été identifiés dans les différents extraits de la plante récoltée dans la région de Mecheria. Ces résultats sont proches de ceux rapportés par (**Hossain et al., 2013**) qui ont montré que les flavonoïdes, les saponines et les triterpènes sont les principaux composés bioactifs fréquemment rencontrés chez l'espèce *T. vulgaris*.

L'extrait hydrométhanolique du thym a montré une présence d'alcaloïdes, de flavonoïdes, de tanins, des coumarines, des triterpènes et des saponines. Ces mêmes groupes chimiques à l'exception des coumarines ont été également identifiés dans l'extrait hydroéthanolique et aqueux de la même plante. Cependant, seul le groupe des triterpènes a été identifié dans l'extrait à l'hexane aqueux.

Plusieurs auteurs ont avancé que le groupe des flavonoïdes présentent un large éventail d'activités biologiques dont antioxydantes, anti-inflammatoires, antimicrobienne, anti-angiogéniques, anticancéreuse et antiallergique (**Ayoola et al., 2008 ; Barile et al., 2007**). Les saponines sont aussi d'autres types de composés bioactifs qui sont impliqués dans la résistance des plantes à certaines maladies phytopathogènes en raison de leurs activités antimicrobiennes (**Anyasor et al., 2010**).

Par ailleurs, les tanins sont des composés phénoliques dont les dérivés sont également considérés comme étant de puissants antioxydants et des capteurs avérés de radicaux libres (**Lee et al., 2002**). Les triterpènes, enfin, retrouvés dans de nombreuses plantes médicinales utilisées en médecine traditionnelle et qui comprennent une large gamme de composés chimiques actifs ont été souvent décrits comme des agents anti-inflammatoires, antiviraux,

antimicrobiens et anti-tumoraux, ainsi que comme des composés immunomodulateurs (**Ríos, 2010**).

L'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* a accusé des teneurs en composés phénoliques totaux (243,74 µg EAG/ml d'extrait) et en flavonoïdes (42,21 µg EQ/ml extrait) supérieures ($p < 0,01$) à celles des autres extraits expérimentaux dont particulièrement l'extrait à l'hexane aqueux qui a présenté de faibles résultats ($p < 0,01$) ; 86,83 µg EAG/ml d'extrait en CPT et 05,12 µg EQ/ml en flavonoïdes.

Par ailleurs, l'extrait hydroéthanolique a enregistré une proportion non négligeable estimée à environ 163,20 µg EAG/ml d'extrait en CPT. Cette valeur s'avère proche à celle trouvée par **Köksal et al. (2016)** (158,0 µg EAG/ml d'extrait) et notablement supérieure aux taux rapportés par (**Nateqi et Mirghazanfari, 2018**). Quant à la teneur en flavonoïdes (37,83 µg EQ/ml extrait) de l'extrait hydroéthanolique, elle semble corroborer nettement avec celle rapportée par plusieurs auteurs (**Nahla et al., 2017 ; Gedikoglu et al., 2019**).

Le taux en polyphénols totaux enregistré dans l'extrait aqueux de thym (126,47 µg EAG/ml d'extrait) a été relativement faible ($p < 0,01$) comparativement aux extraits hydroalcooliques (méthanolique et éthanolique). Ce résultat est remarquablement inférieur au résultat de l'extrait aqueux lyophilisé de thym (256,0 µg EAG/ml d'extrait) rapporté par **Köksal et al. (2016)** et bien supérieur à celui (25,0 µg EAG/ml d'extrait) enregistré dans l'infusion aqueuse étudiée par **Kulišić et al. (2006)**. En outre, la teneur en flavonoïdes (29,55 µg EQ/ml) dans l'extrait aqueux semble proche à celle enregistré dans l'extrait éthanolique de thym (36,0 µg EQ/ml) rapportée par (**Köksal et al., 2016**).

La quantité totale de composés phénoliques a varié ($p < 0,01$) selon les différents extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de 86,83 à 243,74 µg EAG/ml d'extrait. Les résultats obtenus ont montré que le méthanol et l'éthanol sont les meilleurs solvants d'extractions susceptibles d'être utilisés pour extraire le maximum de composés phénoliques de la plante testée. Cela peut être dû à la polarité élevée de ces solvants et à leur bonne solubilité pour les composés phénoliques (**Siddhuraju et Becker, 2003 ; Zhou et Yu, 2004**).

Les résultats ont montré que le méthanol est le meilleur solvant pour l'extraction des composés phénoliques de thym, suivi de l'éthanol, puis de l'eau et l'hexane. Les solvants de plus faible polarité, en particulier l'hexane ont montré une capacité beaucoup plus faible à extraire les composés phénoliques que les solvants polaires. Ainsi, les solvants polaires les

plus puissants ont été plus efficaces pour extraire le maximum de composés phénoliques de la plante étudiée (*T. vulgaris*) que les solvants les moins polaires. Ces résultats sont similaires aux propos rapportés par **(Hernandez-Hernandez et al., 2009)**.

Étant donné que l'estimation de la teneur en composés phénoliques par la méthode Folin-Ciocalteu ne donne pas une image complète et réelle de la qualité et de la quantité des principaux constituants phénoliques, une analyse complémentaire par HPLC a été nécessaire afin de déterminer les constituants bioactifs phénoliques individuels pour chaque extrait de *T. vulgaris*.

Il est bien connu que les plantes médicinales appartenant aux espèces *lamiaceae* contiennent une gamme de métabolites secondaires, tels que les terpénoïdes et les composés phénoliques **(Roby, 2013)**. L'acide gallique, l'acide vanillique, l'acide chlorogénique, l'acide caféique, l'acide cinnamique, l'acide rosmarinique, l'acide benzoïque, l'héspéridine, la rutine, la quercétine, la fisétine, l'apigénine, le thymol, le carvacrol, le Phytol et le Bornéol ont été les principaux composés bioactifs identifiés dans les différents extraits expérimentaux de thym.

Six composés polyphénoliques ont été détectés dans l'extrait hydrométhanolique avec une proportion dominante ($p < 0,01$) d'apigénine glycosylée et de fisétine (98,61 et 82 µg EAG/ml d'extrait) ; alors que les acides rosmarinique et benzoïque ont présenté des taux variables de 17,50 et 15,26 µg EAG/ml d'extrait. En revanche, comparativement à ces derniers composés bioactifs, les quantités de quercétine et d'héspéridine recensées dans cet extrait ont été relativement faible ($p < 0,01$) ; 9,87 et 5,33 % µg EAG/ml d'extrait, successivement.

La consommation constante d'aliments riches en antioxydants naturels est liée souvent à une diminution de la fréquence des problèmes de santé. *T. vulgaris* est sans doute une source importante de composés phénoliques **(Assiri et al., 2016)**. La plante objet d'étude contient une multitude de composés phénoliques chimiquement actifs dont le 4', 5, 7-trihydroxyflavone, l'apigénine est un bioflavonoïde présent principalement dans les pétales des fleurs de la plante **(Havsteen, 2002 ; Ali et al., 2017)**. La fisétine est aussi un autre constituant naturel qui prévient la perte de mémoire et réduit les difficultés d'apprentissage des souris en vieillissant **(Maher et al., 2006)** et que l'on retrouve couramment chez plusieurs espèces de thym ainsi que chez certains fruits et légumes **(Marculescu et al., 2008)**. Les

deux acides phénoliques trouvés dans l'extrait hydrométhanolique de thym (l'acide rosmarinique et l'acide benzoïque) sont souvent rencontrés chez les plantes appartenant à l'espèce *lamiaceae* (**Kulišić et al., 2006 ; Roby et al., 2013**). L'acide rosmarinique a été largement étudié, notamment pour ses effets antioxydants, anti inflammatoires et antiviraux. Par exemple, comme agent antiviral, il a montré des effets contre l'herpès simplex (**Astani et al., 2012**). Une étude a même montré qu'elle pourrait prévenir l'agglomération des peptides β -amyloïdes impliqués dans la maladie d'Alzheimer (**Ono et al., 2012**). L'acide benzoïque (C_6H_5COOH) est largement utilisé dans la fabrication des aliments comme agent antibactérien efficace contre une vaste gamme de pathogènes ; bactéries, levures et moisissures (**Saad et al., 2005 ; Park et al., 2017**). Dans le lait fermenté, l'utilisation de l'acide benzoïque et de ses sels est autorisée et il est généralement pratiqué pour prolonger la durée de conservation des produits (**Yildiz et al., 2011**).

Le taux de quercétine dans les parties aériennes de la plante était conforme à celui rapporté par **Macheix et al. (2005)**. La quercétine est bien connue pour être parmi les flavonoïdes les plus actifs, caractérisée principalement par sa forte capacité antioxydante (**Camuesco et al., 2004 ; Comalada et al., 2005**). De plus, il a été rapporté que ce composé appartenant à la famille des flavonoïdes est considéré comme un puissant agent anticancérigènes et anti-inflammatoire avec des activités bien caractérisées dans l'intestin, les poumons, les seins, la prostate et le foie (**Khurana et al., 2013 ; Khan et al., 2016 ; Elumalai et Lakshmi, 2016**).

La concentration d'hespéridine dans l'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* concorde à celle rapportée par **Aguilar & Hernandez-Brenes (2015)**, qui ont confirmé l'existence de ce type de flavonoïde dans le thym. L'hespéridine est présente naturellement dans le citrus flavedo et est souvent utilisée pour le traitement de la fragilité des vaisseaux sanguins, des maladies cardiovasculaires, des troubles psychiatriques et comme agent anti-inflammatoire, hypolipidémique et diurétique (**Li, et Schluesener, 2017 ; Liu et al., 2017 ; Sun et al., 2017**).

Une composition assez équilibrée en quantité en principaux composés phénoliques a été observée pour l'extrait hydroéthanolique caractérisé particulièrement par une forte concentration en acide gallique (40,66 μg EAG/ml d'extrait) et en apigénine (36,88 μg EAG/ml d'extrait) et des taux relativement variables de 18,91 à 26,32 μg EAG/ml d'extrait en acide cinnamique, acide rosmarinique, rutine et en quercétine.

L'extrait aqueux semble très riche en principaux acides phénoliques dont l'acide gallique (52,15 µg EAG/ml d'extrait) et l'acide rosmarinique (23,16 µg EAG/ml d'extrait) avec de fortes proportions. ($p < 0,01$). L'acide vanillique, l'acide chlorogénique et l'acide caféiques ont été enregistré avec de faibles niveaux ($p < 0,01$). Le même profil en composés phénoliques a été signalé dans le macéra aqueux de thym par **Alu'datt et al. (2016)**.

L'acide gallique ou acide 3,4,5-trihydroxybenzoïque est l'un des acides phénoliques le plus abondant dans le règne végétal. Il s'agit d'un composé cristallin incolore ou légèrement jaune, qui trouve de nombreuses applications dans l'industrie alimentaire et pharmaceutique (**Kahkeshani et al., 2019**). L'acide gallique a été isolé à partir de différentes espèces végétales tel que *Quercus spp* et *Punica spp* par différentes méthodes chromatographiques. Toutefois, de point de vue industriel, l'acide gallique est produit par dégradation hydrolytique de l'acide tannique au moyen d'une glycoprotéine-estérase (**Fernandes et Salgado, 2016**).

L'acide cinnamique et ses dérivés sont naturellement présents dans les aliments d'origine végétale à forte teneur. Parmi les diverses activités biologiques, l'acide cinnamique et ses dérivés sont associés à une influence bénéfique sur le diabète et ses complications (**Adisakwattana, 2017**).

La rutine (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone 3-rhamnoglucoside,) est un flavonol que l'on trouve en abondance dans les plantes comme le sarrasin, le thé et la pomme. C'est un composant nutritionnel vital des aliments (**Harborne, 1986**). Il a démontré un certain nombre d'activités pharmacologiques, notamment antioxydantes, cryoprotectrices, vasoprotectrices, anticancérigènes, neuroprotectrices et cardioprotectrices (**Javed et al., 2012**).

Le profil HPLC de l'extrait aqueux à l'hexane a montré la présence de 4 composés dont le thymol (47,22 µg EAG/ml d'extrait) et le carvacrol (19,73 µg EAG/ml d'extrait) comme composés essentiels les plus dominants, ces résultats sont comparables à ceux rapportés par (**Gavaric et al., 2015**). Le Phytol et le Bornéol ont également été identifiés mais avec une quantité relativement faible. Le thymol et le carvacrol ont été bien reconnus par la FDA (United States Food and Drug Administration) comme étant des composants sûrs (GRAS) ayant de fortes activités antioxydantes et antimicrobiennes. Et d'après la Commission européenne ils peuvent même être utilisés comme composés aromatisants dans les denrées alimentaires (**Ozcan et Chalchat, 2004**).

Le thymol (2-isopropyl-5-méthylphénol) est l'un des constituants les plus fréquents des huiles essentielles ; il est obtenu principalement à partir du thym. C'est le principal dérivé monoterpénique phénolique du cymène, C₁₀H₁₄O, isomère du carvacrol (5-isopropyl-2-méthylphénol) ayant une multitude de propriétés bioactifs : antibactériennes, antifongiques, antivirales, antiseptiques, antitumorales et anti-inflammatoires. Il agit, également, comme antioxydant (piégeur de radicaux libres, agent peroxydant anti-lipidique, etc.) et comme agent biocide en perturbant la membrane bactérienne (**Beena et Rawat, 2013 ; Saad et al., 2010**).

Le carvacrol (CV) est un monoterpénoïde phénolique présent dans les huiles essentielles d'origan (*Origanum vulgare*), de thym (*Thymus vulgaris*), de pepperwort (*Lepidium flavum*), de bergamote sauvage (*Citrus aurantium bergamia*) et bien d'autres plantes végétales. Le carvacrol possède un large éventail d'activités biologiques qui ont trouvé de nombreuses applications cliniques telles antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses. Il est bien établi que l'activité antimicrobienne du carvacrol est plus élevée que celle des autres composés volatils présents dans les huiles essentielles en raison surtout de la présence du groupe hydroxyle libre, de l'hydrophobicité et de la fraction phénol (**Sharifi-Rad et al., 2018**).

Conclusion partielle

A travers cette première étude, il apparaît que les extraits de *T. vulgaris* obtenus à l'aide de solvants à polarité croissante comme le méthanol et l'éthanol ont présentés des taux élevés ($p < 0,01$) en composés phénoliques (163,20 à 243,74 EAG/ml d'extrait) et en composés flavonoïdes (37,83 à 42,21 µg EQ/ml d'extrait) que ceux obtenus par les solvants moins polaires tels l'hexane (86,83 EAG/ml d'extrait vs 05,12 µg EQ/ml d'extrait).

De plus, le screening phytochimique par HPLC a révélé la présence d'une multitude variée de composés phénoliques dans les différents extraits de thym. L'extrait méthanolique s'avère très riche essentiellement en apigénine et en Fisétine ; alors que l'extrait hydroéthanolique est plutôt fortement concentré en acide gallique, rutine et apigénine. Le profil phénolique de l'extrait aqueux est surtout dominé par l'acide gallique et l'acide rosmarinique. Enfin, le thymol et le carvacrol sont les deux composants bioactifs retrouvés dans l'extrait à l'hexane aqueux.

Chapitre II

*Effets inhibiteurs des extraits
phénoliques de *Thymus vulgaris* chez
Streptococcus thermophilus et
*Lactobacillus bulgaricus**

1. Résultats

1.1. Diamètres d'inhibitions

Les activités antibactériennes des différents extraits hydroalcooliques de *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St.thermophilus* et de *Lb.bulgaricus* ont été déterminées par la méthode des disques par diffusion sur gélose, les principaux résultats du test sont présentés dans le **tableau 6**.

Dans ce test, les zones d'inhibition de plus de 7 mm de diamètre ont été considérées comme des résultats positifs. Aux concentrations de 60, 80 et 100% d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* obtenus par usage de solvant à polarité croissante, *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* ont été jugés sensibles, ces concentrations ont produit des zones d'inhibition allant de 7.33 ± 0.57 à 11.0 ± 1.00 mm de diamètre. L'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* a été l'extrait qui a produit les zones d'inhibition les plus larges contre la multiplication de *St.thermophilus* (11.6 mm à 100%). L'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* a été l'extrait qui a produit les zones d'inhibition les plus larges contre la multiplication de *Lb.bulgaricus* (11.0 mm à 100%). Par contre, à 40% d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* obtenus par usage de l'éthanol et de l'eau les zones d'inhibition étaient de $5,33 \pm 0.65$ à $11,00 \pm 1.00$ mm contre le développement des cultures starters de yaourt.

Par ailleurs, la pénicilline a enregistré le plus large diamètre d'inhibition (16.2mm) par comparaison aux différents extraits expérimentaux. La pénicilline (Sigma Aldrich) (2 mg/ml) a été utilisée comme antibiotique de référence contre les espèces bactériennes. La pénicilline a une activité bactéricide contre un large éventail de bactéries gram positives et négatives, et elle est efficace à faibles doses. Cet antibiotique a donc été utilisé comme témoin positif.

L'analyse de variance ($p < 0,01$) montre l'effet hautement significatif des différentes concentrations des extraits phénoliques de *T. vulgaris* sur la variation des diamètres d'inhibitions chez les deux bactéries lactiques (**Figure 18, 19, 20 et 21**).

Tableau 6. Activités antimicrobiennes démontrées par le test de diffusion sur disques des extraits phénoliques de *Thymus vulgaris* chez *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*.

<i>St. thermophilus</i>																				
Type d'extrait	Hexane-eau					Hydroéthanolique					Hydrométhanolique					Aqueux				
Concentrations	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%
Diamètres d'inhibitions (mm)	^d 5.67 ± 0.58	^c 6.6 ± 0.58	^c 8.00 ± 1.00	^b 10.3 ±0.7 0	^b 11.6 ± 1.00	^c 6.33 ± 0.57	^c 6.33 ± 0.57	^c 7.33 ± 0.57	^c 7.66 ± 0.57	^b 10 ± 1.00	^c 4.00 ± 1.60	^{b,c} 6.8 ± 0.57	^{b,c} 7.8 ± 0.08	^b 8.20 ± 1.60	^b 8.66 ± 2.56	^c 1.66 ± 2.78	^d 5.33 ± 0.65	^c 8.00 ± 1.20	^{b,c} 9.3 ± 0.84	^b 11. ± 1.00
Diamètres d'inhibitions de Pc (mm)	^a 14.0±1.00					^a 13.6±0.152					^a 16.2±0.27					^a 13.3±0.57				
Valeur-p	p<0,01					p<0,01					p<0,01					p<0,01				
<i>Lb. bulgaricus</i>																				
Type d'extrait	Hexane-eau					Hydroéthanolique					Hydrométhanolique					Aqueux				
Concentrations	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%
Diamètres d'inhibitions (mm)	^d 6.33 ± 1.16	^d 6.73 ± 0.62	^c 8.33 ± 1.16	^b 10.6 ± 0.58	^b 10.6 ± 1.53	^d 6.33 ± 0.57	^d 6.66 ± 0.57	^c 7.66 ± 0.86	^c 8.33 ± 0.55	^b 10 ± 1.00	^c 5.00 ± 0.435	^{b,c} 6.2 ± 0.57	^{b,c} 8.6 ± 0.57	^{b,c} 9.0 ± 1.00	^{a,b} 11.0 ± 1.00	^c 6.00 ± 1.72	^c 6.49 ± 1.00	^c 7.00 ± 0.57	^c 8.33 ± 2.00	^a 10.33 ± 0.57
Diamètres d'inhibitions de Pc (mm)	^a 15.0±0.20					^a 13.3±0.15					^a 14.0±1.00					^a 14.3±0.57				
Valeur-p	p<0,01					p<0,01					p<0,01					p<0,01				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes suivis des écarts types correspondants ; p<0,01: Effet hautement significatif du facteur étudié ; p:Seuil de probabilité ; a, b, c, d, e : Groupe homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman-Keuls ; Pc : Pénicilline ; mm : millimètre.

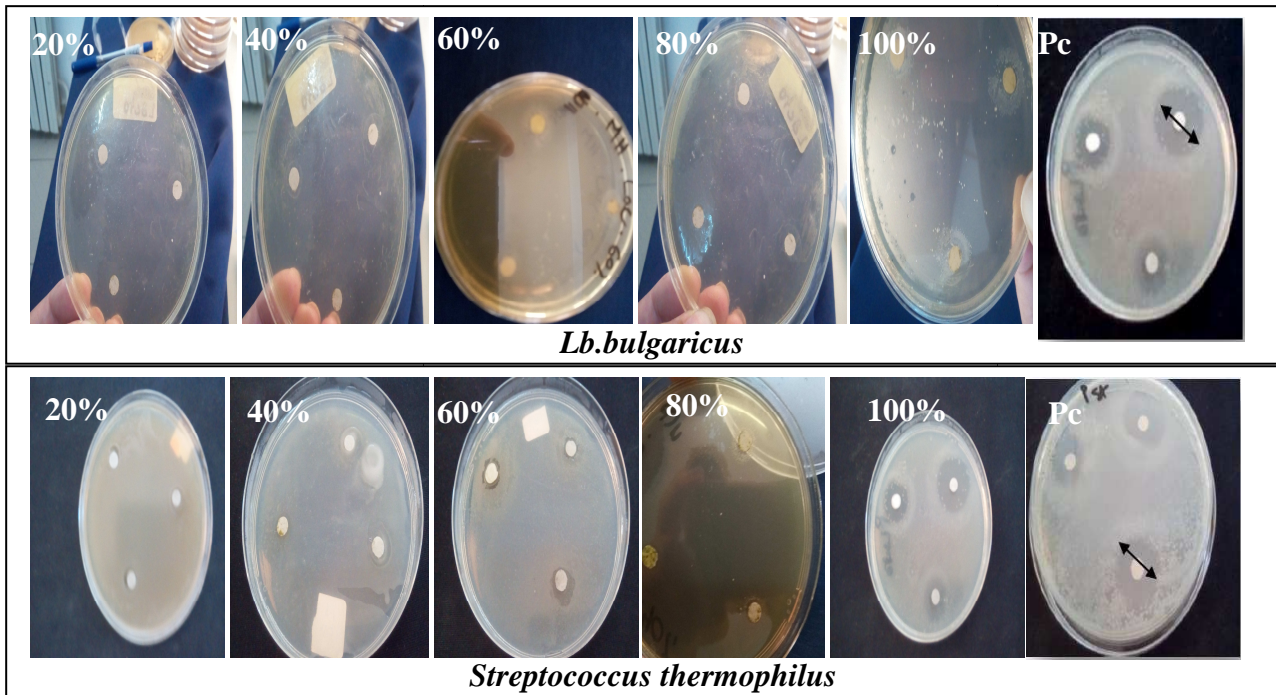


Figure 18. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

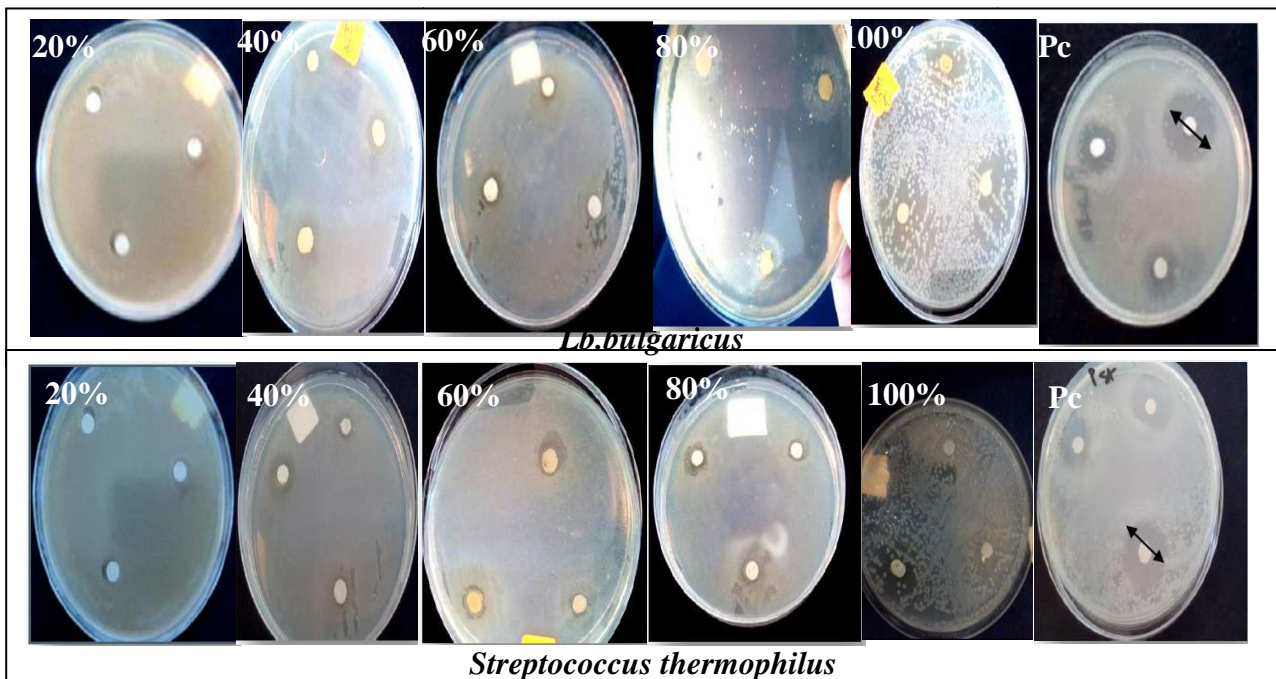


Figure 19. Variation des diamètres d'inhibition de l'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

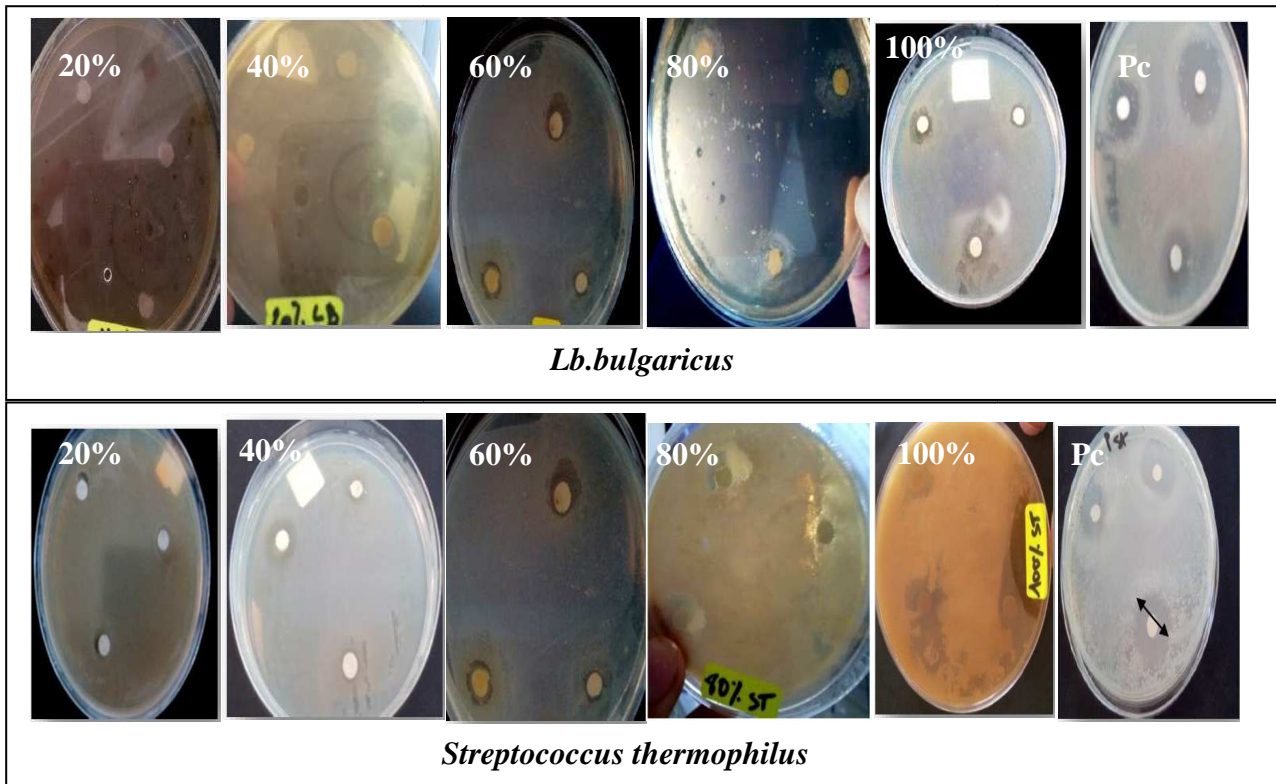


Figure 20. Variation des diamètres d’inhibition de l’extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*

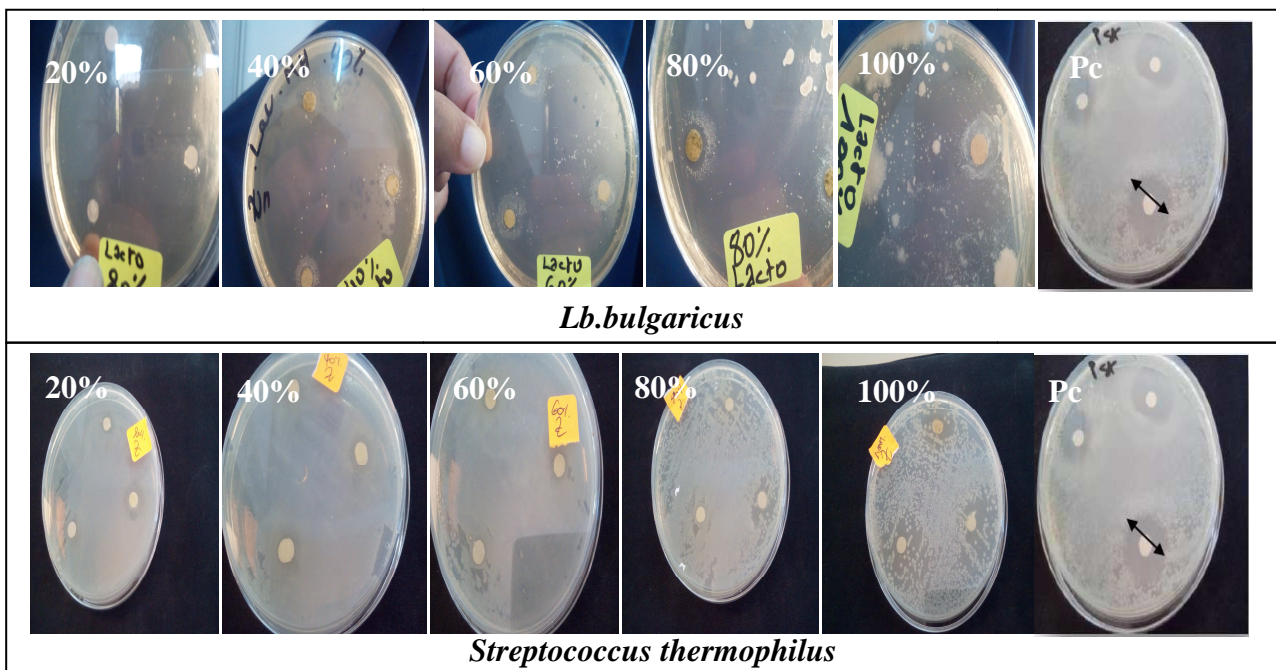


Figure 21. Variation des diamètres d’inhibition de l’extrait aqueux de *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*

1.2. Taux d'inhibition

Les pourcentages d'inhibition de la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* engendrés par l'action bactéricide des différents extraits phénoliques de *T. vulgaris* après 72 heures d'incubation sont indiqués dans le **tableau 7**. La comparaison des taux d'inhibition (%) de croissance de cultures starters du yaourt à l'aide du test l'ANOVA a confirmé qu'il y avait un effet significatif ($p < 0,01$) des différents extraits phénoliques de *T. vulgaris* sur la variation des taux d'inhibitions chez les deux bactéries lactiques.

A des concentrations supérieures à 60%, tous les types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* ont présenté des taux d'inhibition des germes lactiques supérieurs à 50 % avec de faibles écart-types, ce qui indique un effet inhibiteur plus uniforme.

Dans cette étude, les quatre extraits ont montré une activité d'inhibition positive. La plus forte inhibition de la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* a été observée lors du traitement avec l'extrait hydrométhanolique à 100% de concentration (88,1 % $\pm 6,24$ et 85,5 % $\pm 3,26$ respectivement). Par contre, à concentration similaire, le traitement par extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* a induit le plus faible taux d'inhibition des germes étudiés (57,5 % $\pm 4,20$ et 63,1 % $\pm 3,23$ respectivement) par rapport aux autres types d'extraits.

Par ailleurs, tous les extraits phénoliques (hexane, éthanol, méthanol et eau) préparés à 20 et 40% ont induit des taux d'inhibition de croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* inférieur à 50% et allant de 12,4 % $\pm 6,23$ à 49,3% $\pm 6,11$.

La pénicilline était l'agent le plus actif contre la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* avec un taux d'inhibition de 100%. L'inhibition semble être dose-dépendante. À la lumière des résultats présentés dans le **tableau 7**, on a conclu que le type de solvant et la concentration des extraits phénoliques de *T. vulgaris* avaient un effet inhibiteur significatif ($p < 0,01$) sur la multiplication de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

Tableau 7. Taux d'inhibition développés par les extraits phénoliques *T. vulgaris* vis-à-vis à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*

<i>St. thermophilus</i>																				
Type d'extrait	Hexane-eau					Hydroéthanolique					Hydrométhanolique					Eau				
Concentration	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%
Taux d'inhibition (%)	^d 40,4	^d 47,6	^c 57,1	^b 70,8	^b 71,1	^c 46,5	^c 46,8	^c 53,6	^c 56,1	^c 57,5	^c 31,7	^{b,c} 48	^b 65,8	^b 75	^a 88,1	^e 12,4	^d 40,3	^c 55,1	^{b,c} 59	^b 66
Ecart-type	4,19	4,21	5,12	3,38	2,25	4,22	4,62	5,73	4,53	4,20	5,12	4,22	7,13	8,44	6,24	6,23	4,33	7,50	4,56	5,12
Taux d'inhibition de Pc (%)	^a 100					^a 100					^a 100					^a 100				
Valeur p	(p<0,01) **					(p<0,01) **					(p<0,01) **					(p<0,01) **				
<i>Lb. bulgaricus</i>																				
Type d'extrait	Hexane-eau					Hydroéthanolique					Hydrométhanolique					Eau				
Concentration	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%	20%	40%	60%	80%	100%
Taux d'inhibition (%)	^d 42,2	^c 49,3	^c 55,5	^b 64,1	^b 78,5	^d 44	^d 48,7	^c 57,5	^c 62,5	^b 63,1	^c 35,7	^{b,c} 47	^b 61,9	^b 71,1	^a 85,5	^c 41,8	^c 46,7	^c 51,8	^c 58,1	^b 64,1
Ecart-type	6,13	6,11	4,26	7,13	5,25	4,33	4,33	4,52	5,23	3,23	3,11	4,12	4,12	7,14	3,26	2,08	6,97	3,95	4,02	3,85
Taux d'inhibition de Pc (%)	^a 100					^a 100					^a 100					^a 100				
Valeur p	(p<0,01) **					(p<0,01) **					(p<0,01) **					(p<0,01) **				

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes suivies des écarts types correspondants ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée ; p:Seuil de probabilité ; a, b, c, d, e : Groupe homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman-Keuls ; Pc : pénicilline ; mm : millimètre

1.3. Méthode de contact direct

Pour étudier l'activité antimicrobienne des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au développement des cultures de yaourt, diverses concentrations (20, 40, 60, 80 et 100%) de bioactifs naturels de thym ont été ajoutées aux *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*. Le **tableau 8** indique les résultats du dénombrement des cultures starter de yaourt par la méthode de contact direct. L'analyse de la variance révèle l'effet très significatif ($p < 0,01$) des extraits phénoliques de *T. vulgaris* sur la multiplication des cultures lactiques.

Le nombre de *St.thermophilus* et de *Lb.bulgaricus* a tendance de diminuer avec l'augmentation de la concentration en extraits phénoliques passant de 150×10^4 UFC /mL pour l'échantillon témoin (00% extrait phénoliques) à 00 UFC /mL pour les cultures mélangées avec 100% d'extrait phénoliques de *T. vulgaris*. Cette diminution de croissance est enregistrée quel que soit le type d'extrait phénolique appliqué.

A 20% de concentration en extrait phénolique, le nombre de *Lb. bulgaricus* était de 92×10^4 UFC /mL (extrait hexane aqueux), 103×10^4 UFC /mL (extrait hydroéthanolique), 93×10^4 UFC /mL (extrait hydrométhanolique) et de 91×10^4 UFC /mL (extrait hydraulique). Le même résultat avec des petites différences (98, 103, 111 et 115×10^4 UFC /mL) ont été enregistrés pour la croissance de *St.thermophilus* et ce pour la même concentration (20%). Puis des baisses de croissance allant de 50×10^4 UFC /mL à 89×10^4 UFC /mL aux concentrations de 40 et 60% ont été enregistré pour les deux germes lactiques par rapport à l'échantillon témoin (142×10^4 UFC /mL).

Par ailleurs la croissance des deux germes lactiques ne s'annule qu'à partir de concentrations en extraits phénoliques supérieur ou égale à 80 %, à cette concentration, tous les extraits phénoliques de *T. vulgaris* obtenus par usage de solvant à polarité croissante ont exercé un effet inhibiteur de type bactéricide (**figure 22, 23, 24 et 25**).

Tableau 8. Activité antimicrobienne des extraits phénoliques de *T. vulgaris* sur *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* par la méthode de contact direct.

<i>St.thermophilus</i>																								
Type d'extrait	Hexane-eau						Hydroéthanolique						Hydrométhanolique						Eau					
Concentration (%)	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100
Nombre de colonies ($\times 10^4$ UFC /mL)	134	98	85	45	00	00	140	103	81	46	00	00	140	111	92	53	00	00	142	115	92	53	00	00
Groupe homogène	a	b	c	d	e	e	a	b	c	d	e	e	a	b	c	d	e	e	a	b	c	d	e	e
Valeur p	(p<0,01) **						(p<0,01) **						(p<0,01) **						(p<0,01) **					
<i>Lb.bulgaricus</i>																								
Type d'extrait	Hexane-eau						Hydroéthanolique						Hydrométhanolique						Eau					
Concentration (%)	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100	00	20	40	60	80	100
Nombre de colonies ($\times 10^4$ UFC /mL)	150	92	81	51	00	00	137	103	88	53	00	00	133	93	89	59	00	00	132	91	86	57	00	00
Groupe homogène	a	b	c	d	e	e	a	b	b	c	e	e	a	b	b	c	e	e	a	b	b	c	e	e
Valeur p	(p<0,01) **						(p<0,01) **						(p<0,01) **						(p<0,01) **					

Les résultats sont exprimés en valeurs moyennes suivies des écarts types correspondants ; ** : Effet hautement significatif du facteur étudiée ; p:Seuil de probabilité ; a, b, c, d, e : Groupe homogènes de comparaison des moyennes deux à deux selon le test de Newman-Keuls ; UFC : unité formant colonie.

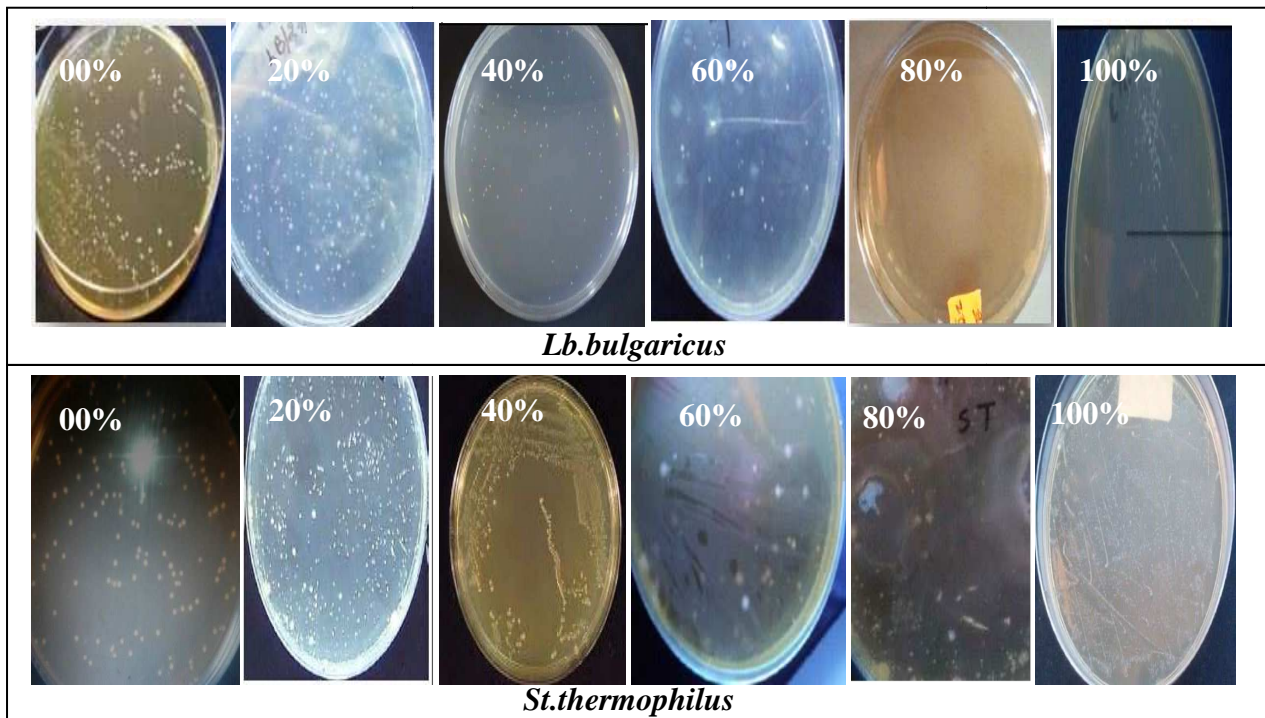


Figure 22. Effet de l'extrait hexane aqueux de *T. vulgaris* sur le taux de croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

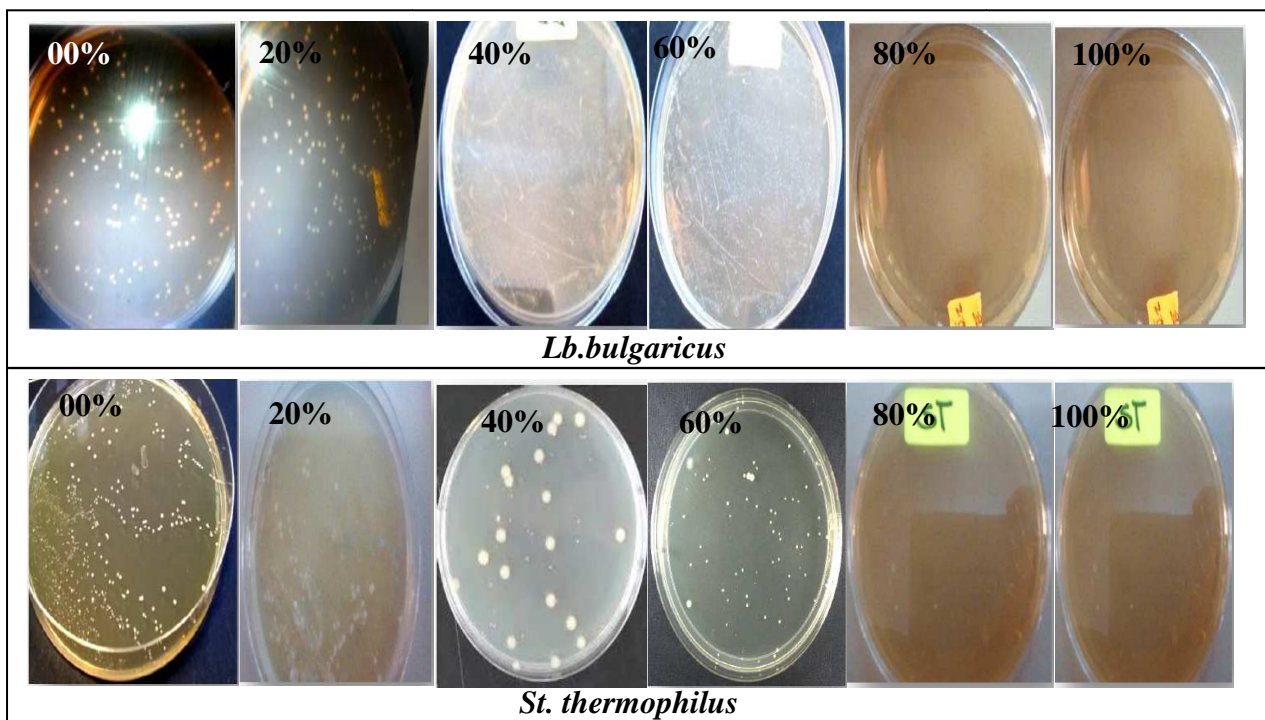


Figure 23. Effet de l'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* sur le taux de croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*.

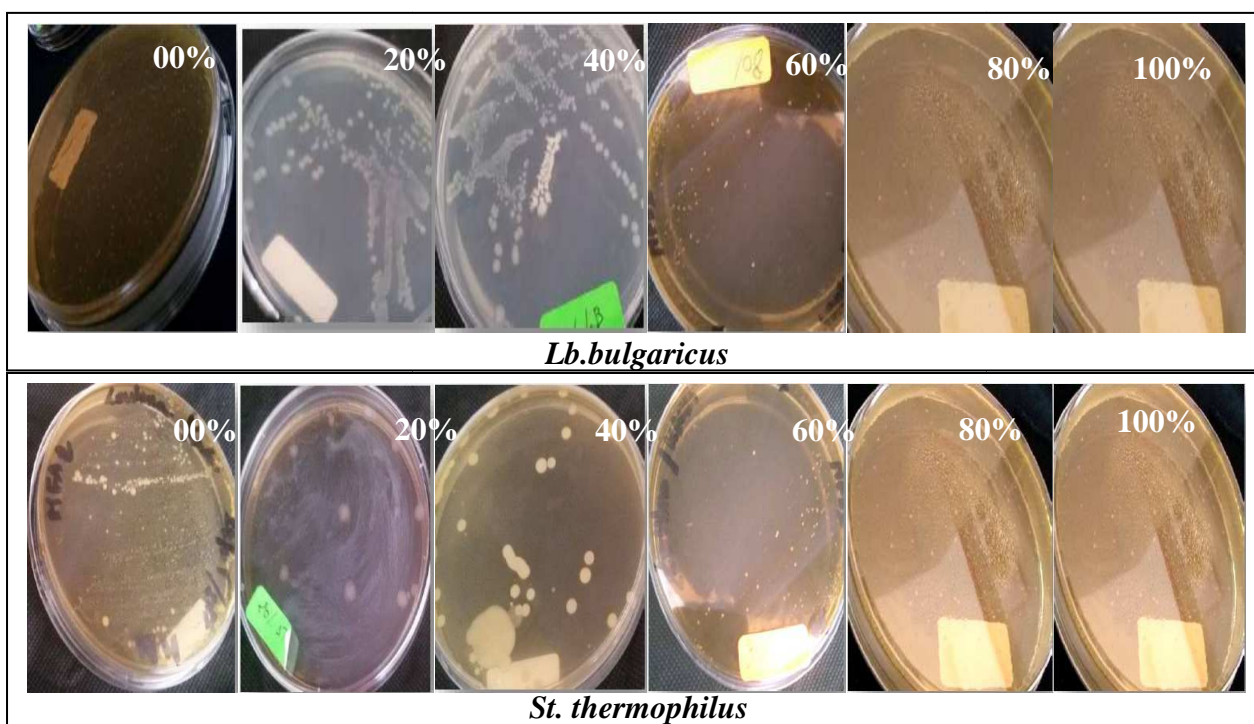


Figure 24. Effet de l'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* sur le taux de croissance de *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*.

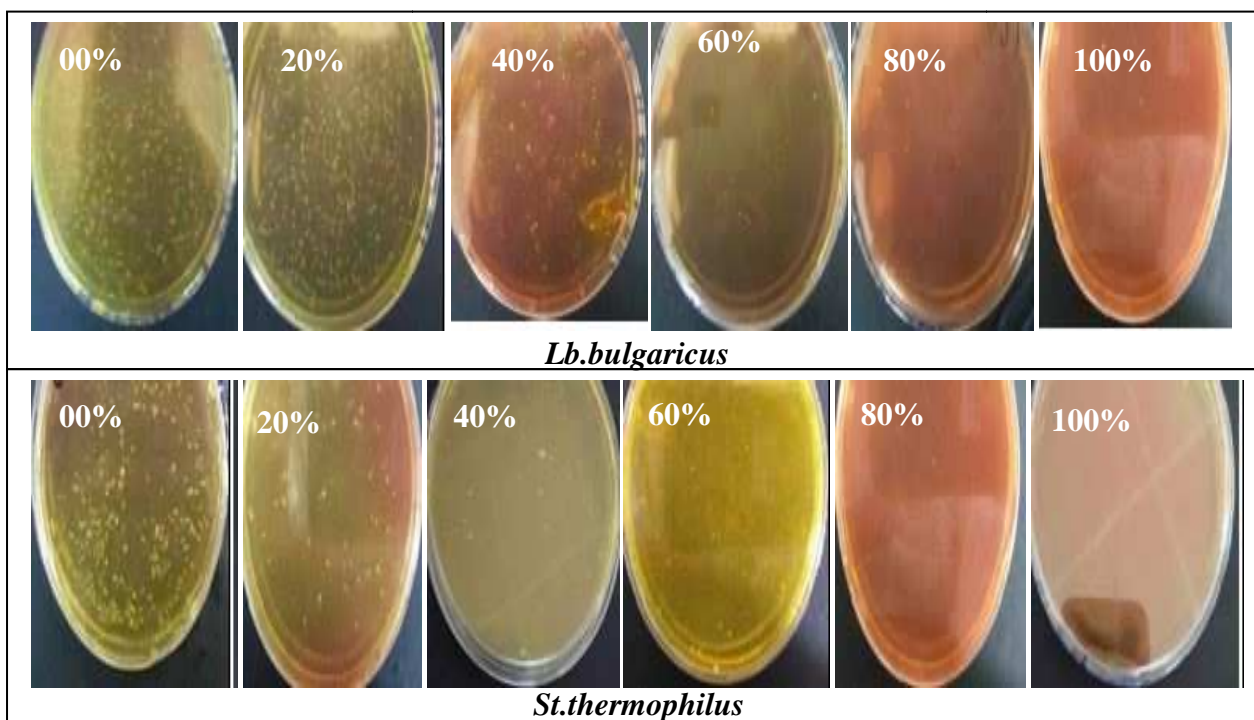


Figure 25. Effet de l'extrait aqueux de *T. vulgaris* sur le taux de croissance de *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*.

1.4. Concentration Minimale Inhibitrice (CMI)

Les concentrations minimales inhibitrices (CMI) des quatre types d'extrait phénoliques (hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux) ont été mesurées. L'essai in vitro a été réalisé à l'aide du test de la turbidité induite par la croissance bactérienne des germes lactiques. Les principaux résultats concernant la mesure du CMI vis-à-vis à la croissance des cultures starter de yaourt sont résumés dans les **tableaux 9 et 10**.

➤ *St.thermophilus*

Les taux de survie du *St.thermophilus* dans les extraits hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux étaient de 67.98, 55.34, 59.07 et de 68.75 % respectivement lorsqu'il était exposé à 20 % de concentration. A 40% d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*, *St thermophilus* a affiché des taux de croissance égal à 43.08, 32.14, 56.75 et 62.50%.

Tableau 9. Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au *St.thermophilus*

Type d'extrait	Concentration (%)	<i>df-di</i>	<i>Df-Di</i>	S (%)	CMI
Hexane -eau	Témoin	0,253	0,253	100	-
	20	0,172		67,98	-
	40	0,109		43,08	-
	60	0,086		00	60%
	80	0,022		00	-
Hydroéthanolique	Témoin	0,253	0,253	100	-
	20	0,140		55,34	-
	40	0,045		32,14	-
	60	0,013		00	60%
	80	00		00	-
hydrométhanolique	Témoin	0,259	0,259	100	-
	20	0,153		59,07	-
	40	0,147		56,75	-
	60	0,086		33,20	-
	80	0,00		00	80%
Hydraulique	Témoin	0,016	0,016	100	-
	20	0,011		68,75	-
	40	0,01		62,50	-
	60	00		00	60%
	80	00		00	-

df-di: différence de densité optique dans la solution d'extrait phénolique ; *Df-Di* : différence de densité optique dans la solution d'eau distillée ;S :Taux de survie du microorganisme

D'après les résultats du **tableau 9** on remarque que le taux de croissance de *St. thermophilus* diminue avec l'augmentation de la concentration de l'extrait de thym quel que soit l'origine de l'extrait (hexane-eau, hydroéthanolique, hydrométhanolique et hydraulique). La multiplication a été arrêtée à des concentrations supérieures ou égales à 60% d'extraits phénoliques. Cette concentration est retenue comme étant la CMI.

➤ *Lb.bulgaricus*

Lb.bulgaricus a présenté des taux de croissance varie entre 23.50% (dans l'extrait hydroéthanolique concentré à 40%) et 88.50% (dans l'extrait hydrométhanolique concentré à 20%). Mais, aucune croissance de *Lb. bulgaricus* n'a été enregistré (00%) dans l'extrait hydraulique de *T.vulgaris* concentré à 40% ce qui correspond à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Par contre la CMI des extraits hexane aqueux, hydroéthanolique et hydrométhanolique a été noté partir d'une concentration égale ou supérieure à 60% où le germe mis à l'étude apparait incapable de survivre après 18 heures d'incubation à la température de 37°C .

Tableau 10. Concentration minimale inhibitrice des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au *Lb.bulgaricus*

Type d'extrait	Concentration (%)	<i>df-di</i>	<i>Df-Di</i>	S (%)	CMI
Hexane -eau	Témoin	0,200	0,200	100	-
	20	0,160		80	-
	40	0,085		42,50	-
	60	0,057		00	60%
	80	0,09		00	-
Hydroéthanolique	Témoin	0,200	0,200	100	-
	20	0,117		58,50	-
	40	0,047		23,50	-
	60	0,00		00	60%
	80	00		00	-
hydrométhanolique	Témoin	0,200	0,200	100	-
	20	0,177		88,50	-
	40	0,144		72,00	-
	60	0,074		00	60%
	80	0,023		00	-
Hydraulique	Témoin	0,007	0,007	100	-
	20	0,006		85,71	-
	40	00		00	40%
	60	00		00	-
	80	00		00	-

df-di: différence de densité optique dans la solution d'extrait phénolique ; *Df-Di* : différence de densité optique dans la solution d'eau distillée ;S :Taux de survie du microorganisme.

1.5. Concentration minimale bactéricide (CMB)

Au cours des dernières décennies, on a constaté un intérêt croissant pour l'utilisation des plantes comme agents antimicrobiens potentiels. Les activités antimicrobiennes des extraits de *T. vulgaris* sur les cultures starter de yaourt n'ont pas encore été étudiées. La présente étude a été menée pour combler cette lacune de recherche en examinant l'activité antimicrobienne des extraits de *T. vulgaris*. L'activité antimicrobienne de différents extraits de solvants (hexane, éthanol, méthanol et eau) de *T. vulgaris* vis-à-vis aux *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* a été examinée aussi à travers la détermination de concentration minimale bactéricide (CMB). Les résultats sont présentés dans le **tableau 11** et les **figures 26 et 27**, montrent une croissance visible des deux espèces de bactéries dans la gélose Mueller Hinton inoculée avec 20 % et 40 % extraits de *T. vulgaris*. Cependant, aucune croissance visible n'a été enregistrée dans les milieux inoculés avec des taux de composés phénoliques supérieurs à 60 %, ce qui correspond à la CMB.

L'analyse du **tableau 11** montre que la concentration minimale des extraits phénoliques de *T. vulgaris* qui a exercé un effet bactéricide est égale à 60% (CMB) et ce quel que soit le type d'extrait (hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique ou hydraulique), cette sensibilité est justifiée par le fait qu'à dose élevé (>60%), les polyphénols ont exercé un effet inhibiteur de type bactéricide contre les cultures starter de yaourt.

De plus, selon les résultats des CMI et des CMB, on a constaté que les quatre extraits phénoliques de *T. vulgaris* exerçaient un effet bactéricide sur les espèces étudiées. Nonobstant la variation des CMB et CMI entre les deux germes lactiques, dans certains cas elles sont égales et indiquant un puissant effet bactéricide. En effet, lorsque le rapport CMB / CMI est inférieur ou égale à deux (2) les polyphénols exercent un effet bactéricide, tandis que si ce rapport est supérieur à 1, les polyphénols sont bactériostatiques (**Kang et al., 2011**). Le **tableau 12** montre les différents rapports CMB / CMI des extraits phénoliques de *T. vulgaris*

Tableau 11. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au développement de cultures starter de yaourt

<i>St. thermophilus</i>					
Type d'extrait	C (%)	Croissance visible	Témoin	Croissance visible	CMB
Hexane-eau	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	--	
Hydroéthanolique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	--	
hydrométhanolique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	--	
Hydraulique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	---	
<i>Lb. bulgaricus</i>					
Type d'extrait	C (%)	Croissance visible	Témoin	Croissance visible	CMB
Hexane-eau	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	--	
Hydroéthanolique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	---	
hydrométhanolique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	--	
	80	---	10 ⁻⁴	--	
Hydraulique	20	+++	10 ⁻¹	+++	60%
	40	++	10 ⁻²	++	
	60	---	10 ⁻³	+	
	80	---	10 ⁻⁴	---	

+++ : Croissance très visible ; ++ : croissance visible ; + : croissance moins visible ; -- : absence de croissance ; CMB : Concentration minimale bactéricide ; C : concentration.

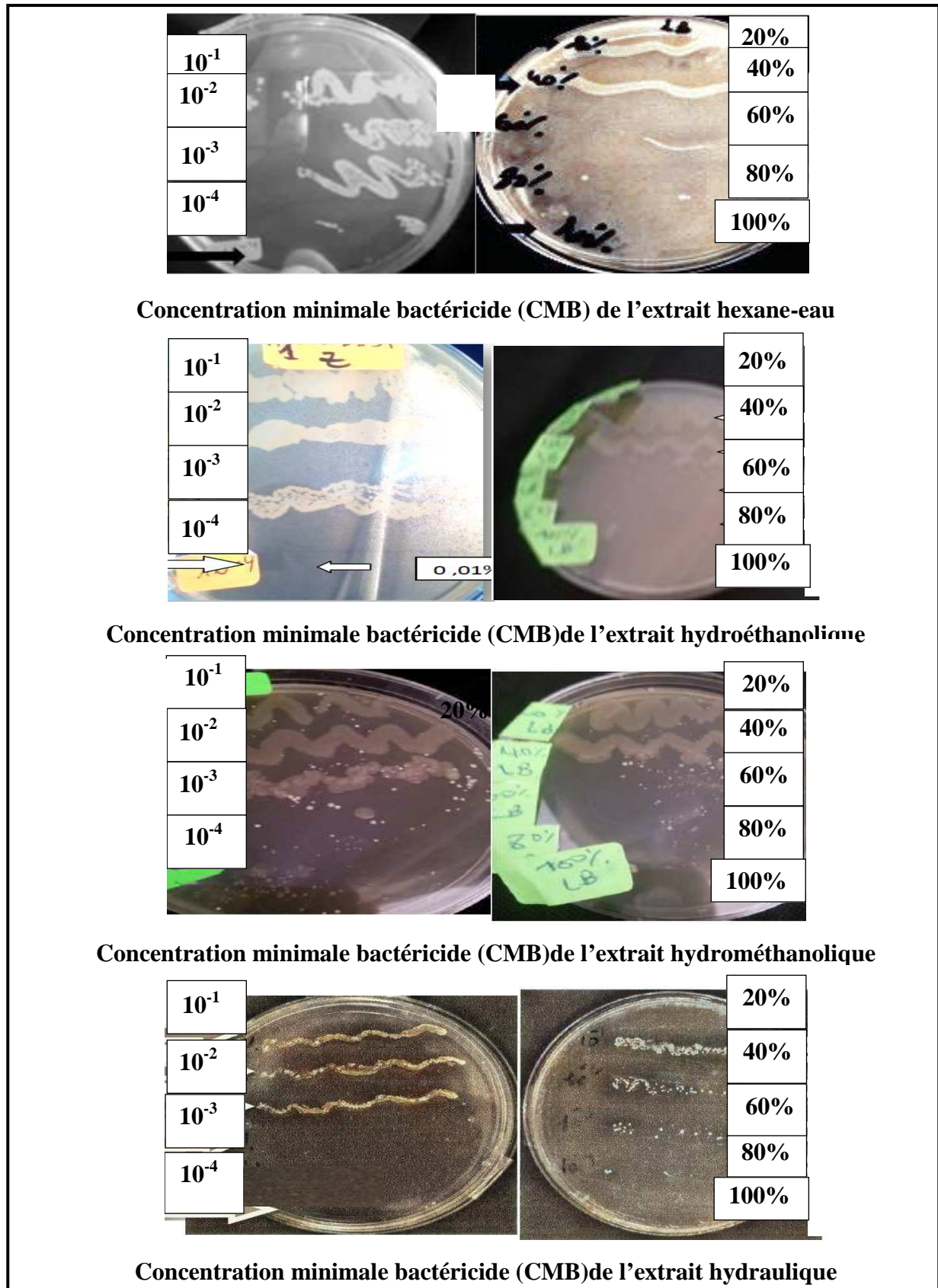


Figure 26. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au développement de *Lb. bulgaricus*

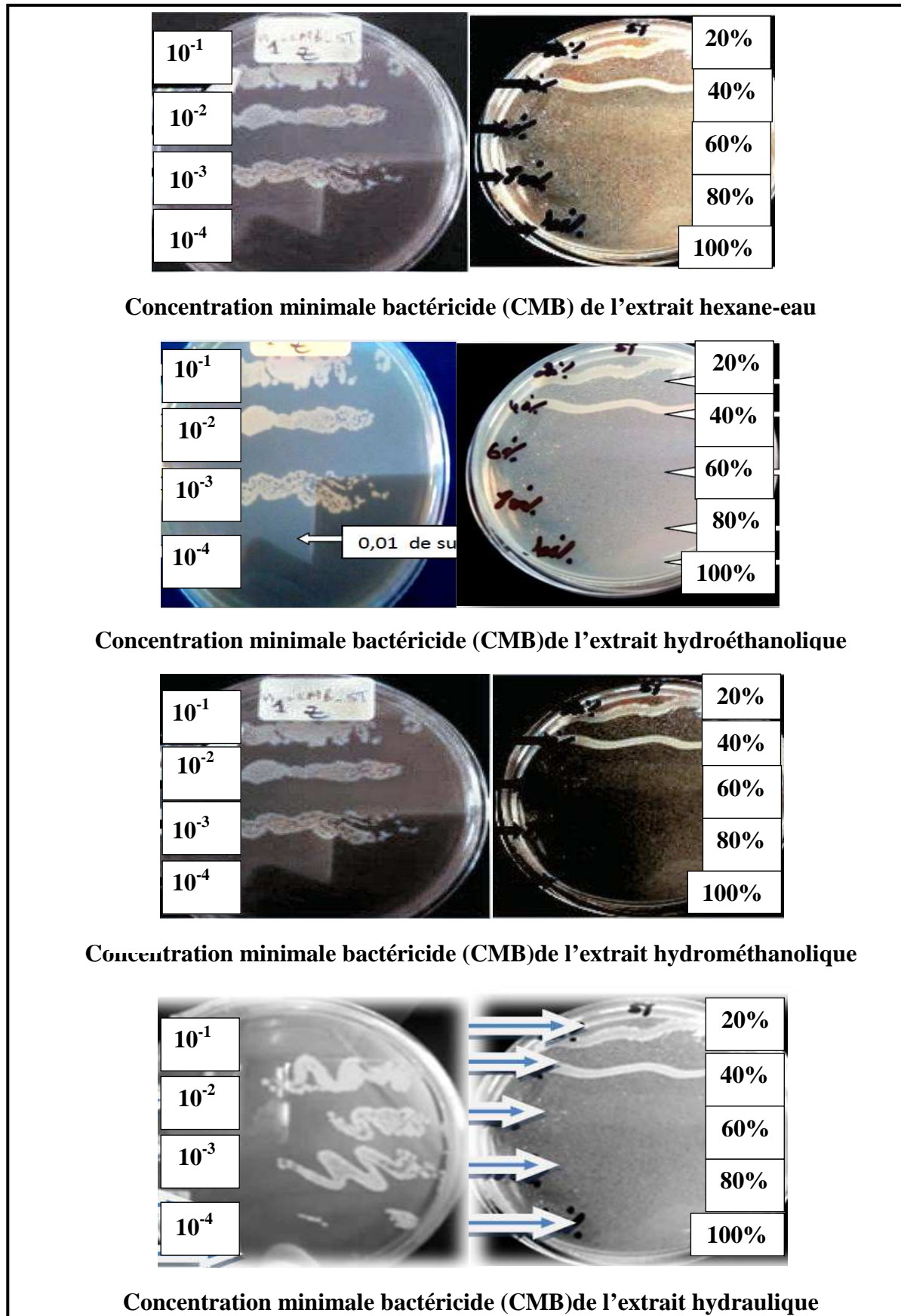


Figure 27. Concentration minimale bactéricide des extraits phénoliques de *T. vulgaris* vis-à-vis au développement de *St. thermophilus*

Tableau 12. Rapports CMB / CMI et interprétation de l'effet

Bactérie	Type d'extrait	CMB / CMI	Effet
<i>St.thermophilus</i>	Hexane-eau	1	Bactéricide
	Hydroéthanolique	1	Bactéricide
	hydrométhanolique	0,75	Bactéricide
	Hydraulique	1	Bactéricide
<i>Lb.bulgaricus</i>	Hexane-eau	1	Bactéricide
	Hydroéthanolique	1	Bactéricide
	hydrométhanolique	1	Bactéricide
	Hydraulique	1,5	Bactéricide

2. Discussion

A travers cette deuxième étude nous avons évalué l'effet inhibiteur des extraits de *T. vulgaris* et comparé l'efficacité des extraits à l'hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et de l'eau sur les cultures starters de yaourt. Afin d'établir l'objectif fixé, les méthodes des disques par diffusion sur gélose et de contact direct ont été utilisées pour étudier l'activité antimicrobienne des extraits et leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) et bactéricides (CMB).

Depuis des siècles, les plantes ont été utilisées à des fins très diverses, allant du traitement des maladies infectieuses à la conservation des aliments et à la production de parfums. Actuellement, la résistance croissante des microorganismes aux antimicrobiens, combinée à l'apparition de maladies émergentes, exige la mise au point urgente de nouveaux médicaments plus efficaces. Les plantes, en raison de la grande diversité biologique et structurelle de leurs composants, constituent une source unique et renouvelable pour la découverte de nouveaux composés antibactériens, antifongiques et antiparasitaires. (Sofowora et al., 2013).

Les extraits des plantes sont des composés naturels de grande activité biologique qui leur permet d'être des additifs naturels dans de nombreux aliments. De nombreuses études ont démontré les propriétés antimicrobiennes des extraits de thym, dont les composants les plus puissants sont les polyphénols (Bagamboula et al., 2004). Ces ingrédients peuvent expliquer les effets bactéricides de la plante comme l'ont montré de nombreuses études (Pirigharnaei, 2012).

L'utilisation des polyphénols dans les aliments a suscité un grand intérêt, en raison de leur action antagoniste contre les microorganismes pathogènes. Cependant, cette action est indésirable pour les aliments probiotiques, comme les produits laitiers.

A doses élevées (>60%), les diamètres des zones d'inhibition ont montré que *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* étaient très sensible vis-à-vis aux différents extraits de *T. vulgaris*. Les zones d'inhibition développées par ces mêmes extraits varient de 7,33 à 11 mm et de 07 à 10,6mm pour les deux germes respectivement. Cependant à 20 et 40% d'extrait phénoliques, les zones d'inhibition étaient moyennement faibles (de 1,66 à 6,80mm pour *St. thermophilus* et de 05 à 6,73mm pour *Lb.bulgaricus*).

A des concentrations très élevés (>60%), les quatre types d'extraits (hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et hydraulique) de *T. vulgaris* ont exercé un effet inhibiteur très avéré. L'inhibition de croissance la plus forte de *St.thermophilus* et de *Lb.bulgaricus* a été observée lors du traitement avec 100% d'extrait de l'hexane aqueux et hydroalcooliques (71,1, 57,5, 88,1 et 66% pour *St.thermophilus* et 78,5, 63,1, 85,5 et 64,1% pour *Lb.bulgaricus*). Les taux d'inhibition les plus faibles ont été enregistrées après traitement des espèces étudiés avec moins de 40% d'extraits phénoliques. A cette concentration les taux de survie varient de 51,3 à 87,6% pour *St. thermophilus* et de 50,7 à 64,3% pour *Lb.bulgaricus*.

L'effet inhibiteur des extraits phénoliques de thym contre la croissance des cultures starter de yaourt a été mesuré par la détermination de la CMI et du CMB qui étaient tous deux identiques (> 60 %). Comme on le sait, les PPs ont le plus grand spectre antibactérien (**Pibiri, 2006**) et sont utiles dans les infections bactériennes, virales et parasitaires, quel que soit leur emplacement (**Borugă et al., 2014**). Les PPs ont différents modes d'action sur les bactéries et agissent soit en endommageant les parois cellulaires des bactéries, ce qui entraîne la perte de constituants cellulaires, soit en bloquant la production d'énergie cellulaire et en détruisant le matériel génétique (**Yang et al., 2008**).

D'après les résultats des **tableaux 9 et 10** on remarque que le taux de croissance de *St. thermophilus* et *Lb.bulgaricus* diminue avec l'augmentation de la concentration en extrait de thym quel que soit l'origine de l'extrait (hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et hydraulique). La multiplication a été arrêtée à des concentrations supérieures ou égales à 60% d'extraits phénoliques. Cette concentration est retenue comme étant la CMI. Ces résultats montrent que l'extrait de *T. vulgaris* réduit le nombre de *St.*

thermophilus et *Lb.bulgaricus* d'une façon intéressante. Bien que l'effet inhibiteur de l'extrait de *T. vulgaris* sur les germes lactiques augmente en fonction de la dose, le taux de survie à des concentrations de 20 et 40% est variable en fonction du type d'extrait (p. ex à 40% d'extrait hydraulique, le taux de survie de *St. thermophilus* est de 62,50% par contre celui de l'extrait hexane aqueux est seulement de 43,08%).

Les souches de *Lb.bulgaricus* et de *St.thermophilus* testées n'ont pas montré de différences significatives dans leur taux de survie (S). Néanmoins, une sensibilité élevée a été détectée pour les deux germes lactiques en augmentant la concentration des extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

D'après **Cox et al. (2000)**, la concentration minimale bactéricide (CMB) de l'extrait d'une plante aromatique est liée au profil chimique de ses constituants. En effet ; **Kinnear et al. (2008)** ont démontré que l'efficacité antimicrobienne des composés bioactifs du thym est en rapport avec leur fort contenu phénolique en particulier en thymol et carvacrol. Ils ont prouvé que plus les teneurs en phénols sont élevées, plus les huiles essentielles sont efficaces, ce qui explique la sensibilité de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* qui augmente avec l'augmentation de la concentration de l'extrait phénolique de la plante.

Les résultats du **tableau 11** indiquent que la concentration minimale des extraits phénoliques de *T. vulgaris vis-à-vis* à la croissance de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* qui a exercé un effet bactéricide est égale à 60% (CMB) et ce quel que soit le type d'extrait (hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique ou aqueux)

Par conséquent, les composés phénoliques de la plante étudiée (*T. vulgaris*) ont exercé à des doses élevées (> 60 %) un effet inhibiteur de type bactéricide sur les deux espèces étudiées (CMB/CMi=1) (**Kang et al., 2011**). Les composants bioactifs récupérés de *T. vulgaris* peuvent offrir une alternative aux antibiotiques de synthèse contre les bactéries pathogènes et banales. Ses effets synergiques peuvent éliminer les germes sans créer de résistance et améliorer la qualité et la stabilité du yaourt (**Bonnardel, 2013**). Le résultat remarquable qui ressort de ces données est que la multiplication des cultures starter de yaourt ne s'arrête qu'à des concentrations élevées d'extraits phénoliques (>60 %). Ces résultats sont en accord avec l'étude menée par **Amirdivani et Baba (2015)**, qui ont conclu que l'incorporation de polyphénols de thé vert à faible dose pendant la fermentation du lait favorise la croissance de *Lactobacillus ssp* et de *St. thermophilus*. Ainsi, **Sun-Waterhouse et**

al. (2013) ont affirmé que l'ajout d'extraits phénoliques de cassis avant la fermentation dans un yaourt enrichi d'une pectine à haute teneur en méthoxyle augmente la croissance de *Streptococcus* et de *Lactobacillus*. Ces résultats appuient la notion d'agents de croissance attribués aux PPs.

Par ailleurs, les résultats ont révélé que les extraits des solvants polaires (éthanol, méthanol et l'eau) présentaient la plus grande action bactéricide. La corrélation entre les composés polyphénoliques et le potentiel inhibiteur explique le puissant effet des solvants polaires utilisés sur la multiplication des germes lactiques (*St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus*)

La concentration des solvants d'extraction (hexane, éthanol, méthanol et l'eau) a affecté de façon significative ($p<0,01$) la survie des cultures starter de yaourt. Les solvants les plus efficaces pour l'extraction des polyphénols étaient l'éthanol et le méthanol ce qui justifie leur haute capacité antibactérienne. Pour les deux extraits de la plante (thym), la teneur en polyphénols des extraits était la plus élevée. L'étude réalisée par **Gonçalves et al. (2012)** a confirmé l'effet inhibiteur considérable des extraits de *T. vulgaris*. Leurs recherches ont montré que l'effet inhibiteur de ces extraits était plus important lorsque ces extraits étaient dissous dans de l'éthanol. Cela peut être dû à la capacité de l'éthanol à dissoudre les composés polaires.

La fermentation du lait par une ou plusieurs espèces lactique (LAB) nécessite une longue période d'incubation, ce qui donne un produit de faible qualité ; ainsi, la fermentation est généralement déclenchée par association coopérative des cultures starter de yaourt. Le yaourt est traditionnellement obtenu par fermentation d'une culture mixte composée de *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*. La viabilité de ces bactéries est principalement affectée par la compétition avec d'autres micro-organismes pathogènes ou de contamination. Il est donc important que les cellules indésirables soient inactivées, sans interférer avec le développement des bactéries bénéfiques (**Amirdivani et Baba ,2015**). D'après les résultats de cette étude on peut conclure que l'ajout des extraits phénoliques de *T. vulgaris* des à valeurs $\leq 40\%$ aux produits laitiers fermentés y compris le yaourt peut présenter une alternative durable pour les conservateurs synthétiques tout en cédant leurs effets bénéfiques sur la santé.

Conclusion partielle

A des concentrations très élevées (>60%), les extraits phénoliques de *T. vulgaris* obtenu par usage de solvants à polarité croissante ont exercé un effet potentiellement inhibiteur contre la croissance des cultures starter de yaourt réduisant leur taux de survie à plus de 50%. En revanche, ces mêmes bactéries (*St.thermophilus* et de *Lb.bulgaricus*) ont bien toléré des doses d'extraits inférieur à 40% présentant un taux de croissance supérieure à 64%. Les extraits phénoliques de *T. vulgaris* se sont révélés être des agents de conservation naturels ayant une activité inhibitrice importante contre les principaux pathogènes et les microorganismes d'altération des produits laitiers dont le yaourt. Toutefois, compte tenu des propriétés favorables des polyphénols à la santé, telles les propriétés antimicrobiennes et les effets antioxydants, il faudrait effectuer une autre étude pour déterminer les concentrations convenables qui doivent être incorporés au yaourt afin de produire un aliment santé. Il est à signaler que l'association des polyphénols avec les cultures starter de yaourt représente le meilleur exemple à étudier. Afin de mieux caractériser cette interaction concernant les effets synergiques entre les polyphénols et les bactéries lactique nous avons réalisé une troisième étude par incorporation des extraits phénoliques de *T. vulgaris* dans la matrice de yaourt et puis nous avons évalué l'influence de ces composés bioactifs sur la qualité physico-chimique, microbiologique et sensorielle afin de mieux comprendre les impacts possibles et l'acceptation par les consommateurs.

Chapitre III

*Evaluation de la qualité d'un yaourt type ferme enrichi en extraits phénoliques de *Thymus vulgaris*.*

Chapitre III : Evaluation de la qualité d'un yaourt type "ferme" enrichi en extraits phénoliques de *Thymus vulgaris*

1. Résultats

1.1. Qualité physicochimique des yaourts

1.1.1. pH

Le pH des yaourts expérimentaux a été mesurée pendant la fermentation et au cours de 21 de stockage à 4°C (**Tableau 13**). Il a été constaté, une diminution significative ($p < 0,05$) des valeurs de pH dans l'ensemble des laits fermentés testés durant ces deux périodes d'étude ; soit des teneurs qui ont variées de 5,83 à 6,49 en moyenne à 0 heure et de 4,30 à 5,08 en moyenne au 21^{ème} jour de conservation.

Durant toute la période expérimentale, l'échantillon témoin a présenté de faibles résultats ($p < 0,01$) par comparaison aux autres produits additionnés d'extraits de *T. vulgaris* ; 4,51 pour le témoin vs 4,52 pour le yaourt enrichi d'extrait à l'hexane aqueux de la plante vs 4,38 pour celui enrichi en extrait hydroéthanolique vs 4,45 pour le produit enrichi en extrait hydrométhanolique et 4,38 pour le yaourt enrichi en extrait à l'eau.

Les laits fermentés additionnés d'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* ont marqué une évolution décroissante de 6,48 à 4,59 en moyenne durant les deux périodes d'essais (**Figure 28**). Par ailleurs, les valeurs de pH ont connu durant ces périodes une augmentation proportionnelle ($p < 0,01$) de 4,30 à 4,59 en fonction des doses variables de 0 à 8% en extrait à l'hexane de thym incorporé dans les produits

Pour les yaourts expérimentaux additionnés d'extrait hydroéthanolique, en général, en fin de la fermentation et durant toute la période de post-acidification les valeurs de pH ont noté une évolution légèrement décroissante avec une forte valeur de 6,07 constatée à 0h dans le yaourt témoin et une faible valeur de 4,42 remarquée au 21^{ème} jour de conservation dans l'échantillon additionné de 8% d'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* (**Figure 29**).

Tableau 13. Variations des valeurs de pH des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de *T. vulgaris* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits dans le yaourt					Effet des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Fermentation	0h	06,48±0,35	06,23±0,43	06,40±0,30	06,32±0,27	06,42±0,37	p>0.05
	2h	4,86 ^c ±0,08	4,84 ^c ±0,06	4,95 ^c ±0,13	5,49 ^b ±0,38	5,94 ^a ±0,15	p<0.01
	4h	5,25 ^a ±0,63	4,83 ^{ab} ±0,09	4,75 ^{ab} ±0,12	4,54 ^{ab} ±0,08	4,42 ^b ±0,10	p<0.05
Post-acidification	7j	4,22 ^b ±0,04	4,30 ^{ab} ±0,73	4,33 ^{ab} ±0,13	4,37 ^{ab} ±0,38	4,48 ^a ±0,15	p<0.05
	14j	4,30 ^b ±0,03	4,33 ^b ±0,09	4,44 ^{ab} ±0,13	4,55 ^a ±0,06	4,59 ^a ±0,10	p<0.01
	21j	4,30 ^b ±0,03	4,33 ^b ±0,09	4,44 ^{ab} ±0,13	4,55 ^a ±0,06	4,59 ^a ±0,10	p<0.01
	Moy.	4,51	4,44	4,49	4,50	4,52	/
Extrait hydroéthanolique							
Fermentation	0h	6,07 ^a ±0,01	6,10 ^a ±0,01	6,08 ^a ±0,02	5,94 ^b ±0,02	5,83 ^c ±0,03	p>0.05
	2h	5,64 ^b ±0,01	5,69 ^a ±0,02	5,69 ^a ±0,02	5,70 ^a ±0,01	5,61 ^c ±0,01	p<0.01
	4h	4,69 ^b ±0,01	4,74 ^a ±0,02	4,76 ^a ±0,01	4,65 ^c ±0,01	4,61 ^d ±0,02	p<0.05
Post-acidification	7j	4,35 ^d ±0,01	4,48 ^c ±0,01	4,51 ^c ±0,01	4,54 ^b ±0,01	4,58 ^a ±0,01	p<0.05
	14j	4,51 ^{ab} ±0,01	4,43 ^c ±0,01	4,41 ^d ±0,01	4,49 ^b ±0,01	4,52 ^a ±0,01	p<0.01
	21j	4,42±0,02	4,35±0,01	4,31±0,01	4,4±0,01	4,43±0,01	p<0.01
	Moy.	4,49	4,50	4,49	4,52	4,53	/
Extrait hydrométhanolique							
Fermentation	0 h	6,46 ^c ±0,01	6,46 ^c ±0,01	6,52 ^a ±0,01	6,50 ^b ±0,01	6,50 ^b ±0,01	p>0.05
	2h	5,69 ^c ±0,01	5,54 ^e ±0,01	5,56 ^d ±0,01	6,02 ^a ±0,01	5,78 ^b ±0,01	p<0.01
	4h	5,09 ^a ±0,01	5,16 ^d ±0,01	5,03 ^e ±0,01	5,20 ^c ±0,01	5,22 ^b ±0,01	p<0.05
Post-acidification	7j	4,85 ^c ±0,35	4,98 ^b ±0,15	5,00 ^b ±0,15	5,04 ^b ±0,46	5,19 ^a ±0,26	p<0.05
	14j	4,95 ^b ±0,47	5,04 ^b ±0,10	5,04 ^b ±0,01	5,05 ^b ±0,03	5,01 ^b ±0,02	p<0.01
	21j	4,87±0,45	5,07±0,81	5,08±0,78	5,03±0,11	5,07±0,82	p<0.01
	Moy.	4,94	5,06	5,03	5,08	5,12	4,87
Extrait hydraulique							
Fermentation	0 h	6,07 ^a ±0,01	6,44 ^a ±0,01	6,34 ^a ±0,02	6,41 ^b ±0,25	6,44 ^c ±0,26	p>0.05
	2h	5,87 ^b ±0,06	5,16 ^a ±0,02	5,48 ^a ±0,02	5,43 ^a ±0,01	5,44 ^c ±0,01	p<0.01
	4h	4,66 ^b ±0,01	4,70 ^a ±0,02	4,71 ^a ±0,01	4,63 ^c ±0,01	4,65 ^d ±0,02	p<0.05
Post-acidification	7j	4,74 ^a ±0,01	4,65 ^b ±0,01	4,68 ^{ab} ±0,01	4,72 ^a ±0,01	4,68 ^{ab} ±0,01	p<0.05
	14j	5,02 ^d ±0,01	4,84 ^c ±0,01	4,95 ^c ±0,01	4,03 ^b ±0,01	4,04 ^a ±0,01	p<0.01
	21j	4,92 ^a ±0,02	4,73 ^b ±0,01	4,98 ^a ±0,01	4,95 ^a ±0,01	4,98 ^a ±0,01	p<0.01
	Moy.	4,83	4,73	4,83	4,58	4,58	/

Les données sont exprimées en valeurs moyennes suivies d'écart types correspondants avec un nombre de répétitions n = 3, h : heures ; j : Jours ; Moy. : valeur moyenne ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc. : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

En fonction des doses d'extrait de thym incorporées les valeurs de pH s'avèrent proportionnelles aux concentrations d'extrait à l'éthanol ajoutées dans les laits fermentés

($p < 0.01$) ; soit des augmentations de 4,42, à 4,35 à 4,31, à 4,40 et à 4,43 pour les doses additionnées de 0, 2, 4, 6 et 8% respectivement dans les produits.

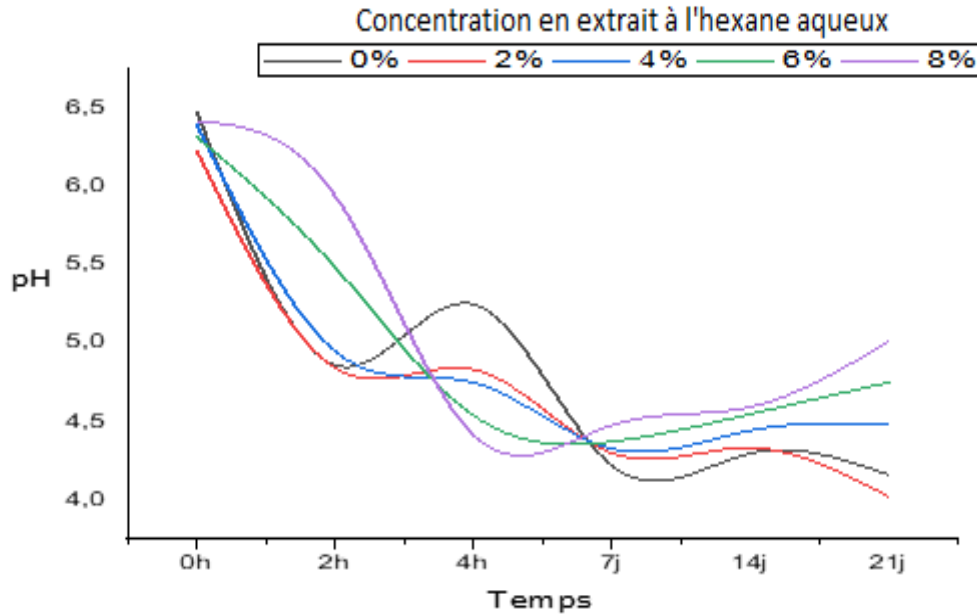


Figure 28. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait à l'hexane-aqueux de *T.vulgaris*

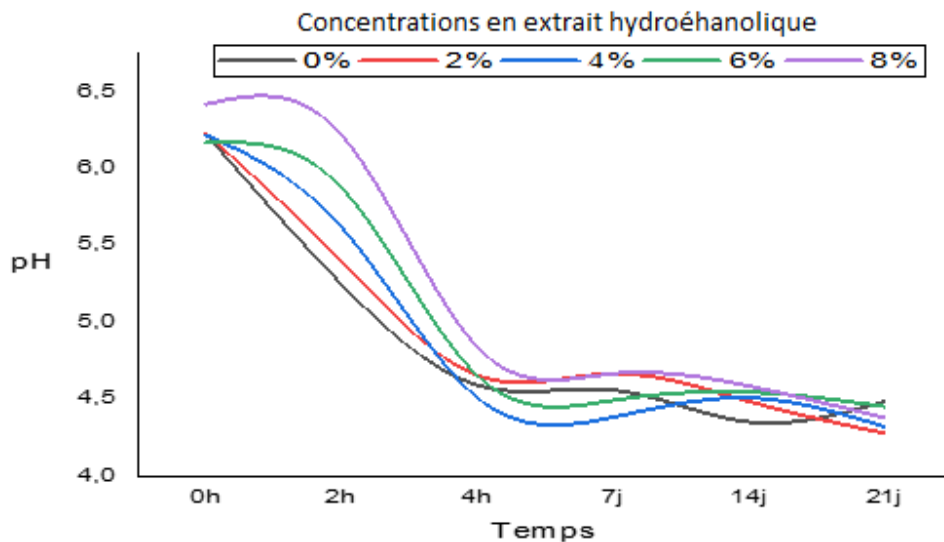


Figure 29. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris*

En général, durant toute la période de la fermentation et de post acidification, les valeurs de pH des essais à l'extrait hydrométhanolique de *T.vulgaris* ont enregistré une nette diminution de 6,46 à 5,57, en moyenne (**Figure 30**). Selon les doses d'extrait incorporées variables de 0, à 2, 4, 6, et 8% le pH a connu aussi des hausses significatives ($p < 0.01$) de 4,87 à 5,07 à 5,31 à 5,43 et à 5,57, en moyenne respectivement dans les produits.

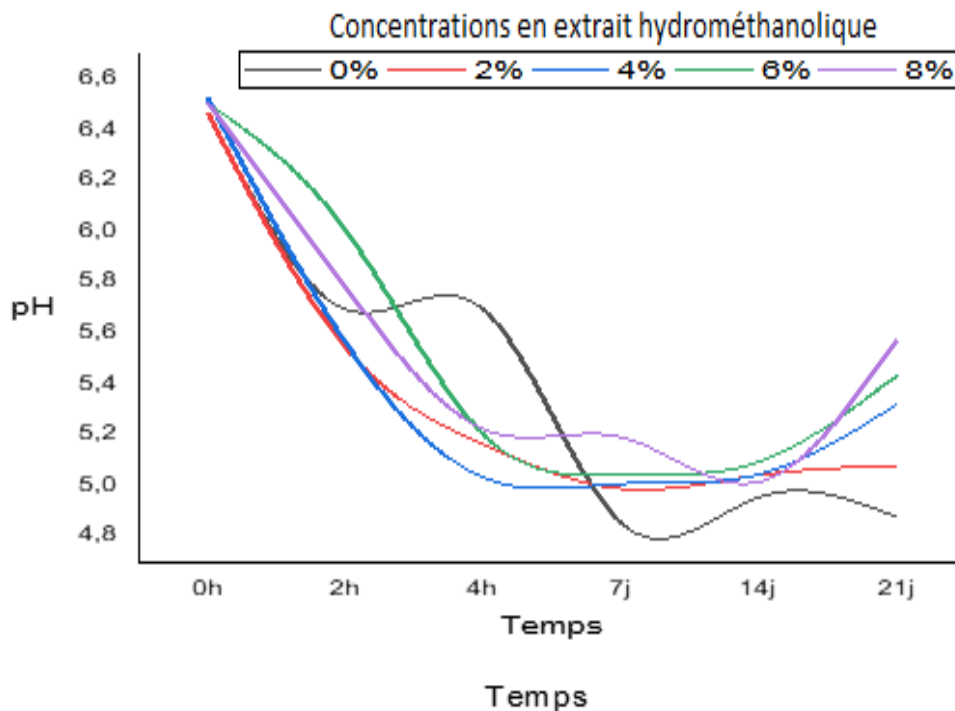


Figure 30. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de *T.vulgaris*

Les valeurs de pH de l'ensemble des échantillons préparés à différentes doses d'extrait aqueux de *T. vulgaris* ont diminué progressivement de 6,07 à 4,66 de 0 à 4 heures de fermentation. Par contre, durant toute la période de post-acidification les laits expérimentaux ont noté une faible augmentation de pH ; soit des valeurs qui ont varié de 4,69, à 4,98 et à 4,9 pendant respectivement le 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour de conservation (**Figure 31**). L'analyse de variance montre des augmentations significatives ($p < 0.05$) des valeurs de pH en fonction des

concentrations d'extrait aqueux de *T.vulgaris* incorporées dans les laits fermentés au cours des périodes de fermentation et de post-acidification (**Tableau 13**).

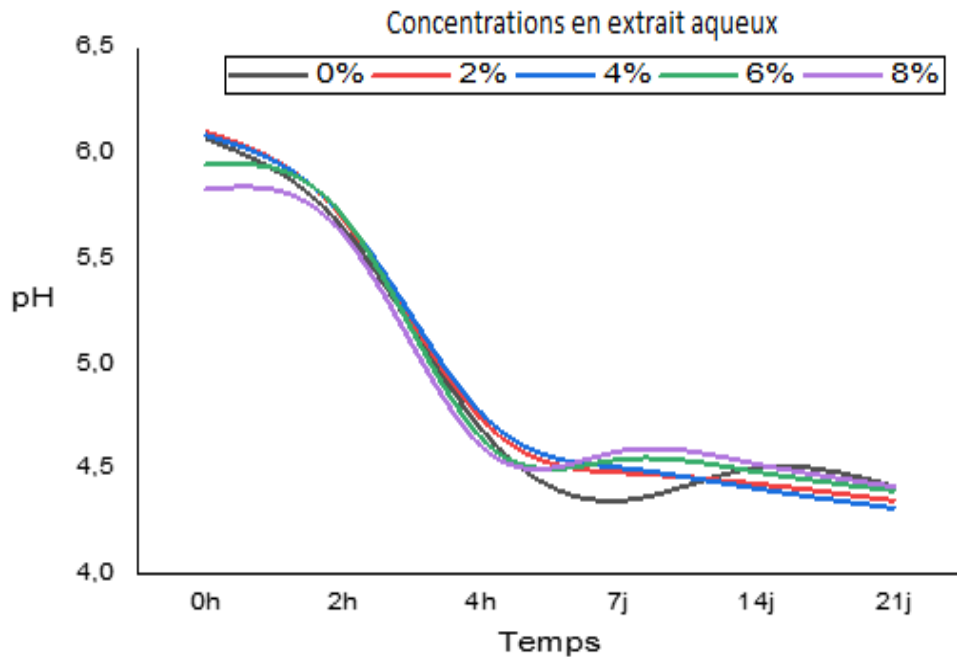


Figure 31. Evolution des valeurs de pH des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait aqueux de *T.vulgaris*

1.1.2. Acidité

L'acidité des yaourts préparés sans et avec les extraits de *T. vulgaris* a marqué une nette augmentation durant toute la période expérimentale ; avec des valeurs qui ont varié de 15,7 à 20 °D au début de la phase de fermentation et de 72,33 à 111°D à la fin de la phase de post-acidification. Par ailleurs, pendant l'expérimentation, il a été constaté une évolution décroissante (de 94,16 à 72,16°D, en moyenne) de l'acidité en fonction de l'augmentation de (0 à 8%) des taux d'incorporation d'extraits de thym dans les laits fermentés expérimentaux (**Tableau 14**).

Tableau 14. Variations de l'acidité (°D) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de *T. vulgaris* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits dans le yaourt					Effet des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Fermentation	0h	15,7 ^c ±2,06	18,33 ^a ±3,05	16,96 ^b ±2,00	18,16 ^a ±1,25	17,4 ^b ±3,53	p>0.05
	2h	24,86 ^a ±0,95	25,33 ^a ±5,43	22,2 ^b ±0,3	20,7 ^c ±2,40	19,6 ^c ±0,7	p<0.01
	4h	88,36 ^a ±3,26	86,96 ^a ±1,98	83,06 ^b ±1,12	76,33 ^c ±1,32	73,96 ^c ±0,25	p<0.05
Post-acidification	7j	96,93 ^a ±6,72	94,7 ^a ±4,70	85,3 ^b ±3,60	80,73 ^b ±1,53	77,8 ^b ±1,67	p<0.05
	14j	88,6 ^a ±3,03	80,53 ^b ±1,84	78,9 ^b ±1,65	73,63 ^c ±1,55	72,73 ^c ±0,83	p<0.01
	21j	98,6 ^a ±3,03	90,53 ^b ±1,84	88,9 ^b ±1,65	83,63 ^c ±1,55	79,73 ^d ±0,83	p<0.01
	Moy.	93,12	88,18	84,79	78,58	76,05	/
Extrait hydroéthanolique							
Fermentation	0h	18 ^c ±1	19 ^b ±1	20 ^a ±1	20 ^a ±1	18,33 ^b ±1,5	p>0.05
	2h	49 ^a ±4,58	41,33 ^a ±1,5	30 ^b ±1	25 ^b ±2,64	27,33 ^b ±8,02	p<0.01
	4h	75,3 ^{ab} ±8,14	75 ^a ±1	86,66 ^a ±7,63	76 ^{bc} ±4,58	78,6 ^{bc} ±8,50	p<0.05
Post-acidification	7j	70,33 ^c ±5,50	82 ^a ±2,64	75,66 ^b ±12,0	70 ^c ±1	77,66 ^b ±17,7	p<0.05
	14j	103,3 ^b ±11,5	86 ^{ab} ±9,16	79,33 ^c ±16,2	82,3 ^a ±4,93	79,66 ^c ±2,08	p<0.01
	21j	103,3 ^a ±4,72	90 ^a ±3,60	75 ^b ±3,60	90.1 ^a ±6,24	72,33 ^b ±4,93	p<0.01
	Moy.	88,05	83,25	79,16	79,6	77,06	/
Extrait hydrométhanolique							
Fermentation	0 h	18,02 ^a ±0,01	17,00 ^b ±0,01	17,00 ^b ±0,01	16,00 ^c ±0,02	16,00 ^c ±0,02	p<0.01
	2h	45,00 ^a ±0,02	37,00 ^b ±0,02	35,00 ^c ±0,02	30,00 ^d ±0,01	30,00 ^d ±0,02	p<0.01
	4h	90,00 ^a ±0,02	85,00 ^b ±0,01	82,00 ^c ±0,02	80,00 ^d ±0,01	72,00 ^e ±0,01	p<0.05
Post-acidification	7j	92,66 ^a ±0,01	83,33 ^b ±0,02	72 ^c ±0,01	71 ^c ±0,01	69 ^c ±0,02	p<0.05
	14j	96 ^a ±0,02	85 ^{ab} ±0,01	80 ^b ±0,01	76 ^b ±0,01	73,66 ^b ±0,01	p<0.01
	21j	98 ^a ±0,01	85,33 ^b ±0,02	80 ^c ±0,01	78,33 ^c ±0,02	74 ^d ±0,01	p<0.01
	Moy.	94,16	84,65	78,5	76,33	72,16	/
Extrait aqueux							
Fermentation	0 h	17,33 ^b ±1,5	18,33 ^b ±1,5	18 ^b ±1	20 ^a ±1	19 ^a ±1	p>0.05
	2h	54 ^a ±1	73 ^a ±1	47,66 ^c ±1,5	51 ^b ±1	50 ^b ±1	p<0.01
	4h	75 ^a ±1	73 ^a ±1	70,66 ^b ±1,5	74 ^a ±1	71 ^a ±1	p<0.05
Post-acidification	7j	90 ^a ±1	91 ^a ±2,6	84 ^b ±1	81 ^b ±1	83 ^b ±1	p<0.05
	14j	107,6 ^a ±1,5	101 ^a ±1	92 ^d ±1	90 ^c ±1	88 ^c ±1	p<0.01
	21j	103 ^a ±1	105 ^b ±1	94 ^c ±1,5	94 ^b ±1	89 ^b ±1	p<0.01
	Moy.	93,9	92,5	85,16	84,75	82,75	/

Les données sont exprimées en valeurs moyennes suivies d'écarts types correspondants avec un nombre de répétitions n = 3, h : heures ; j : Jours ; Moy. : valeur moyenne ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

La première période de fermentation a noté une augmentation notable de l'acidité des laits fermentés additionnés d'extrait à l'hexane aqueux ; de 17,72°D à 0h à environ 80,07°D, en moyenne après 4 heures de fermentation.

La phase de post-acidification à son tour a été caractérisée par une augmentation de l'acidité des laits fermentés à 87,09 °D au 7^{ème} jour, puis les valeurs ont diminué légèrement à 78,28°D au

14^{ème} jour, pour atteindre 88,28 °D en moyenne à la fin de la période de conservation (**Figure 32**).

A partir du 1^{er} jour, en fin de la période de fermentation et durant toute la phase de post-acidification, l'acidité s'est avérée d'autant plus réduite ($p < 0,01$) de (68,84, à 66,06, à 62, 55, à 58,86 et à 56,37°D, en moyenne) que le niveau d'incorporation d'extrait à l'hexane de thym est respectivement augmenté de (0, à 2, à 4, à 6 et à 8%) dans les essais expérimentaux.

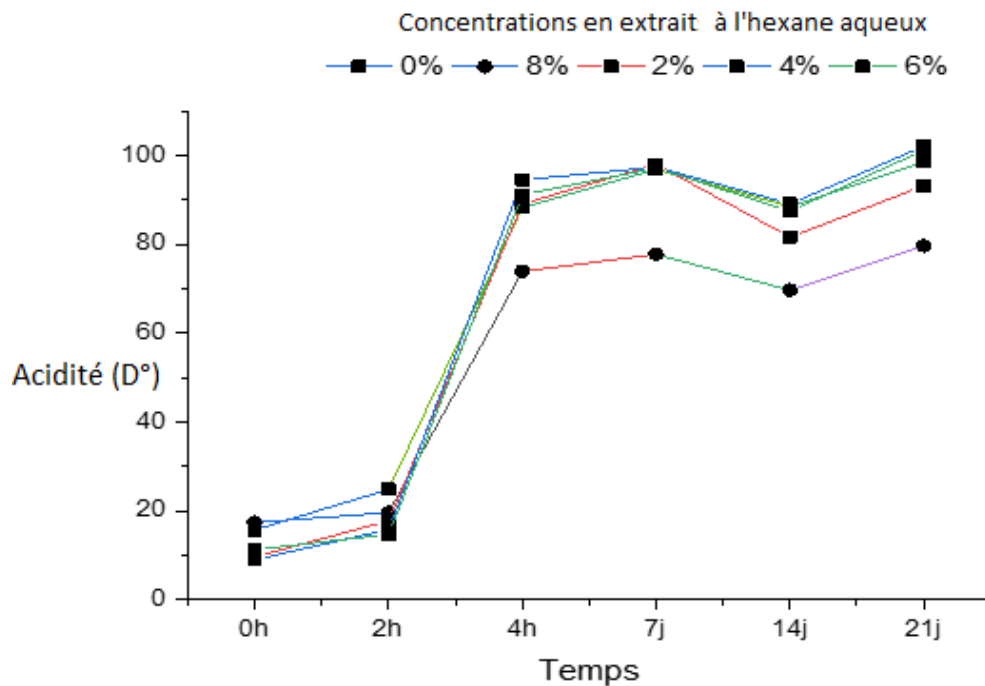


Figure 32. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait à l'hexane aqueux de *T.vulgaris*

De 0 à 4 heures de la période de fermentation, l'évolution de l'acidité des laits fermentés additionnés d'extrait hydroéthanolique de thym a été marquée par une élévation croissante de 19,06 à 0h à 75,13°D, en moyenne. Pendant la phase de post-acidification, l'acidité des laits fermentés a augmenté de 75,93°D au 7^{ème} jour à 98,53°D au 14^{ème} jour, puis elle a diminué légèrement à 88,93°D en moyenne au 21^{ème} jour (**Figure 33**).

L'acidité s'avère aussi diminuer sensiblement ($p < 0,01$) avec les doses en cet extrait de thym incorporées dans les produits ; soit des valeurs qui ont varié de 88.05, à 83.25 à 79.16 à 79.6 et à 77.06 °D en moyenne avec les taux d'incorporation variables, respectivement de 0, 2, 4, 6, 8. L'analyse de la variance a montré l'effet hautement significatif ($p < 0,01$) des taux d'extrait hydroéthanolique de thym sur les variations de l'acidité des laits fermentés au 1^{er}, 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période de fermentation et de post-acidification.

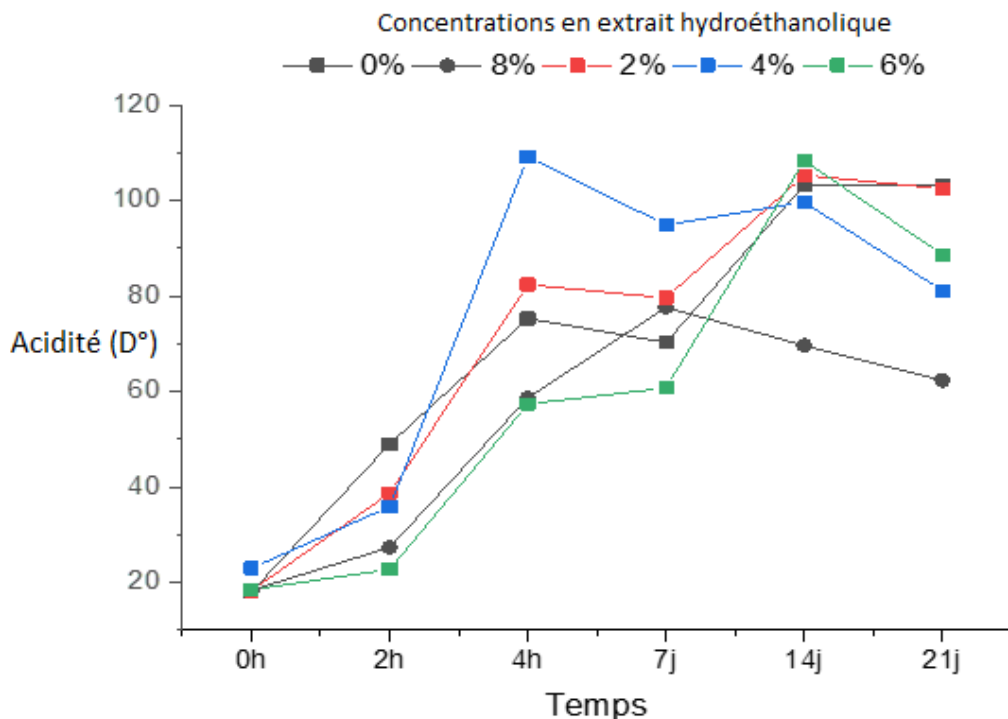


Figure 33. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris*

L'acidité des laits fermentés additionnés d'extrait hydrométhanolique de thym a connu une augmentation croissante de 16,80 °D pendant les premières heures du processus de transformation à 81,8 °D en fin de la phase de production, après 4 heures de fermentation. Au cours de la phase de post-acidification, l'acidité des laits fermentés a passé de 77,61 °D au 7^{ème} jour, à 82,13 °D au 14^{ème} jour et à 83,13 °D au 21^{ème} jour de conservation. (**Figure 34**).

Par ailleurs, les variations des doses d'extrait hydrométhanolique de thym de 0, à 2, à 4, à 6 et à 8%, à engendré des diminutions remarquables ($p < 0.05$) de l'acidité des laits fermentés ; 94.16 vs 84,65 vs 78,5 vs 76,33 vs 72,16 °D, en moyenne, respectivement. L'analyse de la variance a dévoilé des effets hautement significatifs des taux d'extrait hydrométhanolique de thym incorporé sur les variations de l'acidité des laits fermentés particulièrement au 1^{er}, 14^{ème} et 21^{ème} jour de la période de post-acidification.

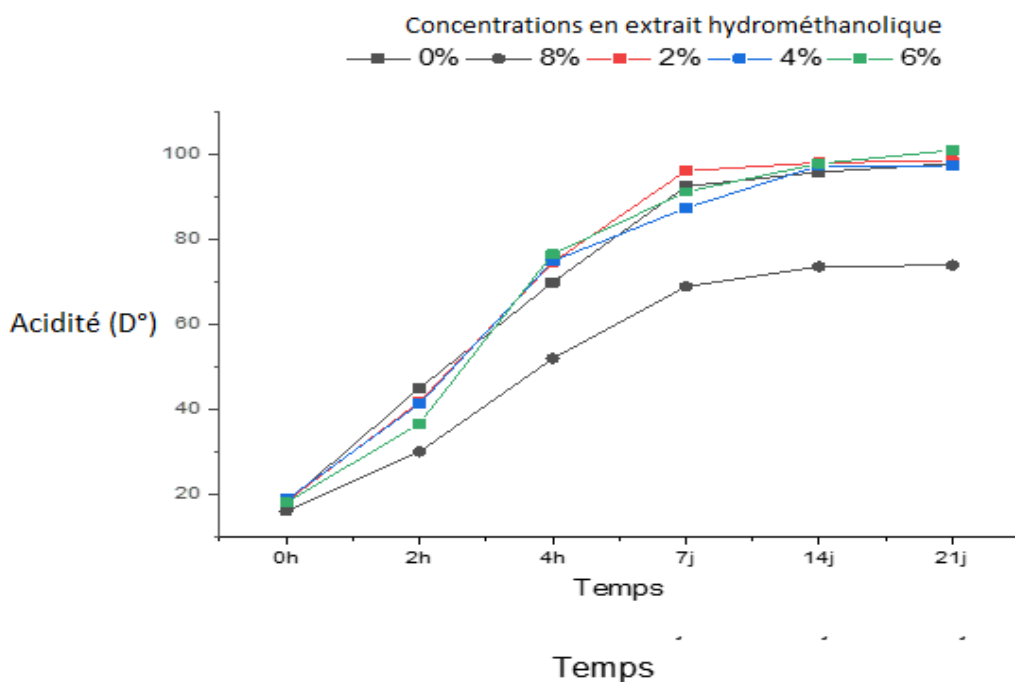


Figure 34. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de *T.vulgaris*

Du début à la fin de la période de fermentation, l'acidité des laits fermentés additionnés d'extrait aqueux de *T.vulgaris* a dévoilé une évolution croissante de 18,53 à 72,73 °D, en moyenne. En revanche, durant la phase de post-acidification, l'acidité des produits a continué à augmenter vers 87,4 °D au 7^{ème} jour et à 99,53 °D au 14^{ème} jour pour diminuer légèrement à 95,73 °D en moyenne au 21^{ème} jour (**Figure 35**).

En outre pendant ces deux périodes d'essais, l'acidité s'est avérée inversement proportionnelle ($p < 0,01$) aux doses d'extrait à l'eau de thym incorporées dans les produits expérimentaux ; soit des valeurs qui ont diminué légèrement de 93,9 à 92,5 à 85,16 à 84,75 et à 82,75°D en moyenne pour les doses de 0, 2, 4, 6 et 8% ajoutées respectivement, dans les laits fermentés.

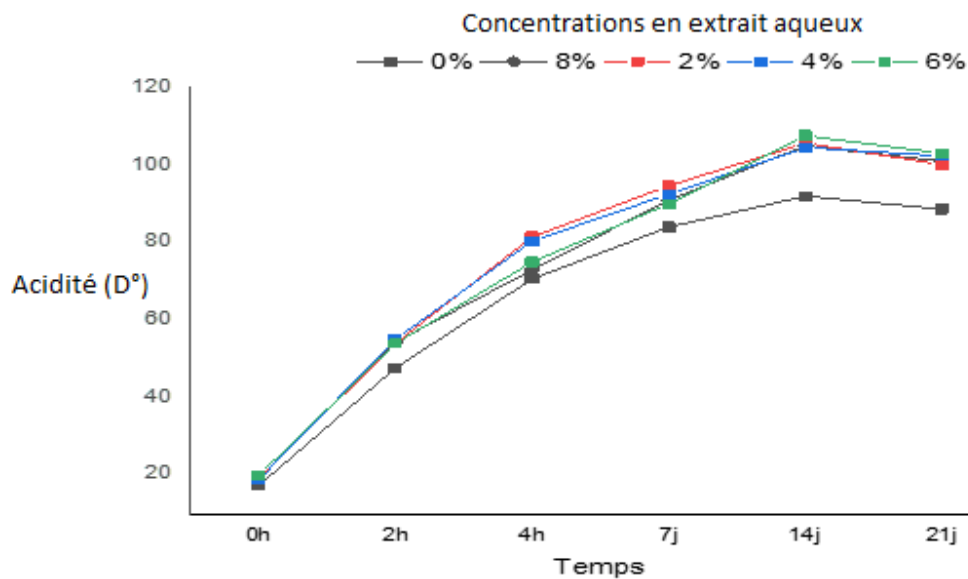


Figure 35. Evolution de l'acidité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait aqueux de *T. vulgaris*

1.1.3. Viscosité apparente

Le (Tableau15) fait apparaître les résultats de viscosité apparente des yaourts expérimentaux pendant 21 jours de stockage à 4 °C. Globalement, il résulte sommairement que la viscosité des produits enrichis en différents extraits de *T. vulgaris* est relativement inférieure à celle du témoin, sans extraits phénoliques de la plante. En outre, les valeurs enregistrées dans les échantillons expérimentaux ont une tendance à augmenter jusqu'au 14^{ème} jour et ensuite à diminuer relativement aux 21^{èmes} jours de conservation au froid.

Tableau 15. Variations de la viscosité apparente (Kg/ms) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de *T. vulgaris* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits dans le yaourt					Effet des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Fermentation	0h	81,3 ^{ab} ±1,56	83,4 ^{ab} ±3,00	86,08 ^a ±2,93	79,06 ^b ±0,54	82,6 ^{ab} ±1,21	p>0.05
	2h	131,3 ^a ±1,49	105,06 ^b ±5,6	98,69 ^c ±0,35	91,89 ^d ±0,48	88,34 ^d ±1,19	p<0.01
		4h	220,1 ^a ±0,35	195,2 ^b ±3,03	180,6 ^c ±0,68	176,5 ^d ±1,27	170,4 ^e ±0,57
Post-acidification	7j	400,3 ^a ±1,70	368,1 ^b ±24,9	317,7 ^c ±2,15	293,7 ^d ±6,88	220,8 ^e ±0,13	p<0.05
	14j	551,8 ^a ±1,58	497,4 ^a ±2,18	464 ^{ab} ±4,53	417 ^{ab} ±1,85	306,0 ^b ±170	p<0.01
	21j	398,8 ^a ±1,16	383,2 ^b ±0,96	349,7 ^c ±1,55	310,3 ^d ±2,18	298,1 ^e ±0,5	p<0.01
	Moy.	297,33	272,10	249,64	228,13	194,42	/
	Extrait hydroéthanolique						
Fermentation	0h	95,10 ^a ±0,01	88,44 ^b ±0,04	71,02 ^c ±0,02	33,32 ^d ±0,02	22,72 ^e ±0,02	p>0.05
	2h	122,1 ^a ±0,02	100,9 ^b ±0,02	86,13 ^c ±0,01	39,52 ^d ±0,02	24,32 ^e ±0,02	p<0.01
		4h	160,2 ^a ±0,03	146,8 ^b ±0,03	101,3 ^c ±0,03	45,41 ^d ±0,01	33,22 ^e ±0,02
Post-acidification	7j	198,6 ^a ±0,03	152,3 ^b ±0,02	141,9 ^c ±0,02	78,53 ^d ±0,03	43,71 ^e ±0,02	p<0.05
	14j	230,4 ^a ±0,01	186,3 ^b ±0,01	172,4 ^c ±0,01	82,91 ^d ±0,01	64,36 ^e ±0,01	p<0.01
	21j	524,3 ^a ±0,01	441,8 ^b ±34,6	195,5 ^c ±0,01	90,8 ^d ±0,60	69,24 ^d ±0,03	p<0.01
	Moy.	255,15	186,13	128,08	61,75	42,93	/
	Extrait hydrométhanolique						
Fermentation	0 h	83,3 ^{ab} ±1,56	74,08 ^a ±2,93	66,6 ^{ab} ±1,21	79,4 ^{ab} ±3,00	70,06 ^b ±0,54	p>0.05
	2h	119,3 ^a ±1,49	92,69 ^c ±0,35	77,34 ^d ±1,19	99,06 ^b ±5,6	88,89 ^d ±0,48	p<0.01
		4h	211,1 ^a ±0,35	179,6 ^c ±0,68	159,4 ^e ±0,57	188,2 ^b ±3,03	169,5 ^d ±1,27
Post-acidification	7j	528,1 ^a ±1,49	478,4 ^b ±1,49	368,6 ^b ±1,49	351,2 ^c ±1,49	330,8 ^c ±1,49	p<0.05
	14j	413,8 ^c ±1,49	418,3 ^c ±1,49	444,8 ^a ±1,49	383,6 ^d ±1,49	416,1 ^b ±1,49	p<0.01
	21j	368,1 ^c ±1,49	412,7 ^a ±1,49	402,9 ^b ±1,49	349,6 ^d ±1,49	343,7 ^d ±1,49	p<0.01
	Moy.	287,28	275,96	253,2	241,84	236,5	/
	Extrait aqueux						
Fermentation	0 h	78,08 ^a ±0,03	73,15 ^b ±0,03	71,04 ^c ±0,03	35,32 ^d ±0,02	21,72 ^e ±0,02	p>0.05
	2h	112,1 ^a ±0,02	102,9 ^b ±0,02	88,13 ^c ±0,01	39,52 ^d ±0,02	25,32 ^e ±0,02	p<0.01
		4h	150,2 ^a ±0,03	135,8 ^b ±0,03	101,3 ^c ±0,03	49,41 ^d ±0,01	35,22 ^e ±0,02
Post-acidification	7j	190,6 ^a ±0,03	149,3 ^b ±0,02	138,9 ^c ±0,02	75,53 ^d ±0,05	50,7 ^e ±0,02	p<0.05
	14j	220,4 ^a ±0,02	188,3 ^b ±0,03	175,4 ^c ±0,02	87,90 ^d ±0,01	66,33 ^e ±0,02	p<0.01
	21j	440,3 ^a ±0,02	321,8 ^b ±0,02	183,5 ^c ±0,03	91,13 ^d ±0,03	69,24 ^e ±0,03	p<0.01
	Moy.	241,63	161,91	126,42	63,14	44,77	/

Les données sont exprimées en valeurs moyennes suivies d'écart types correspondants avec un nombre de répétitions n = 3, h : heures ; j : Jours. ; Moy. : valeur moyenne ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

En effet, la viscosité des laits fermentés supplémenté d'extrait hexane aqueux de thym à nettement augmenté depuis le début de la phase de fermentation au 1^{er} jour jusqu'au 14^{ème} jour de la période de post acidification (p<0,05) ; 82,51 à 447,46 Kg/ms, en moyenne. Au 21^{ème} jour de conservation, la viscosité des échantillons a présenté une légère baisse à 348, 09 Kg/ms, en

moyenne (**Figure 36**). De plus, une relation inversement proportionnelle ($p < 0,01$) entre la viscosité et la concentration en extrait à l'hexane aqueux variable de 0, à 2, à 4, à 6 et à 8% a été établie dans les produits pendant les deux périodes d'essais ; 297.33, 272.10, 249.64, 228.13 et 194.42 Kg/ms, en moyenne, respectivement.

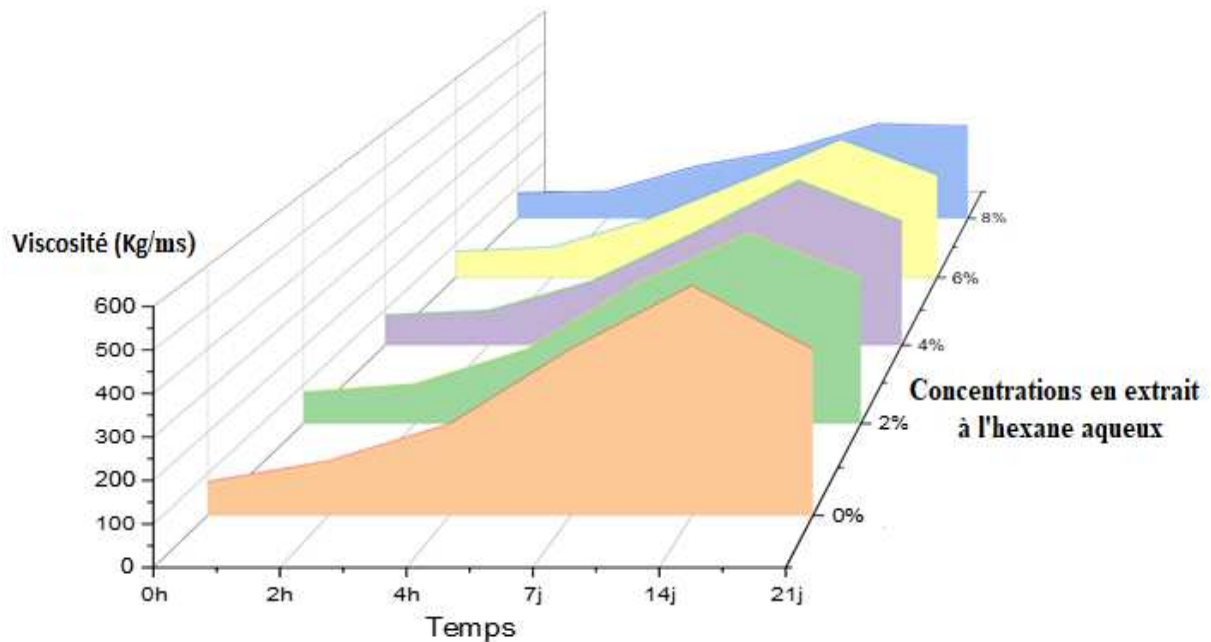


Figure 36. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait à l'hexane aqueux de *T.vulgaris*.

Concernant les laits fermentés additionnés d'extrait hydroéthanolique, durant les deux périodes d'études de fermentation et de post-acidification, les valeurs ont augmenté remarquablement de 62,12 à 304,35 Kg/ms, en moyenne (**Figure 37**). Par ailleurs, il a été observé une baisse significative ($p < 0,05$) de la viscosité avec l'augmentation des taux d'incorporation de thym (de 0 à 8%) dans les essais de lait fermenté ; soit une chute de 255,15 à 42,93 Kg/ms, en moyenne.

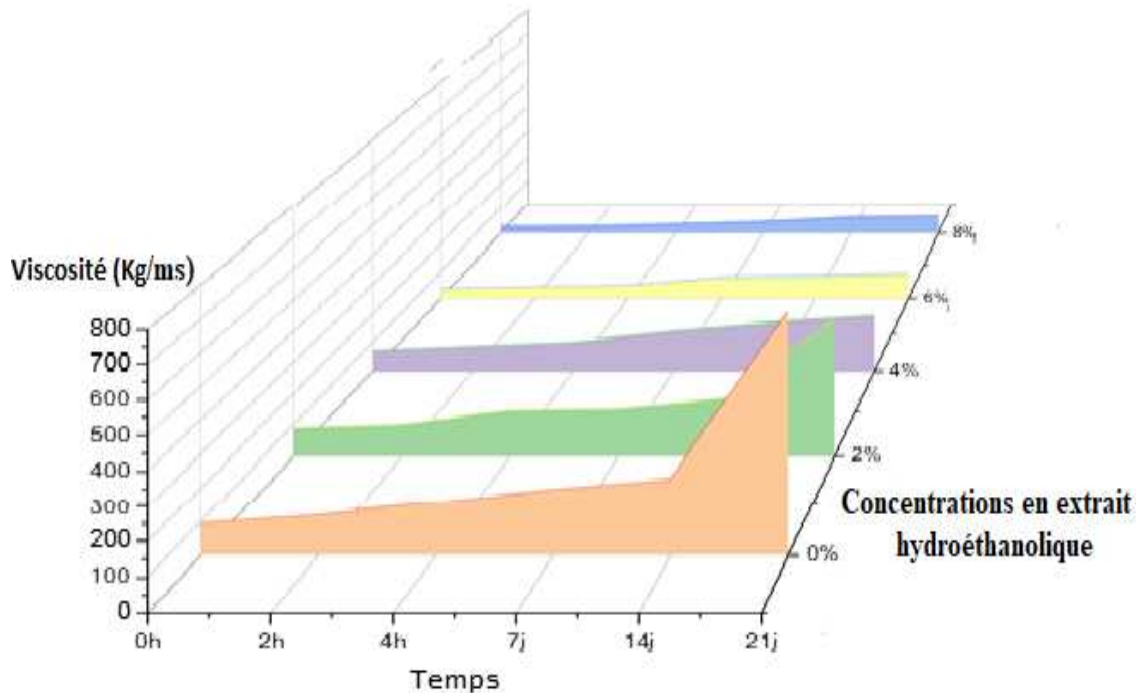


Figure 37. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris*.

Durant l'expérimentation, la viscosité des yaourts à base d'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* sensiblement augmenté à 181,56 et à 415,32 kg/ms, en moyenne après 4 heures de fermentation et au 14^{ème} jour de la période de post-acidification ; puis elle est abaissée relativement pendant la période d'entreposage au froid à 4°C jusqu'à atteindre 375,4 kg/ms, en moyenne, au 21^{ème} jour (**Figure 38**).

De plus, au cours de ces deux périodes d'étude, en fonction des concentrations d'extrait de thym croissantes de (0, à 2, à 4, à 6 et à 8%) la viscosité des produits testés a varié significativement ($p < 0.05$) de 287,28 à 275,96, à 253,2 à 241,84 et à 236,5 kg/ms, en moyenne, successivement.

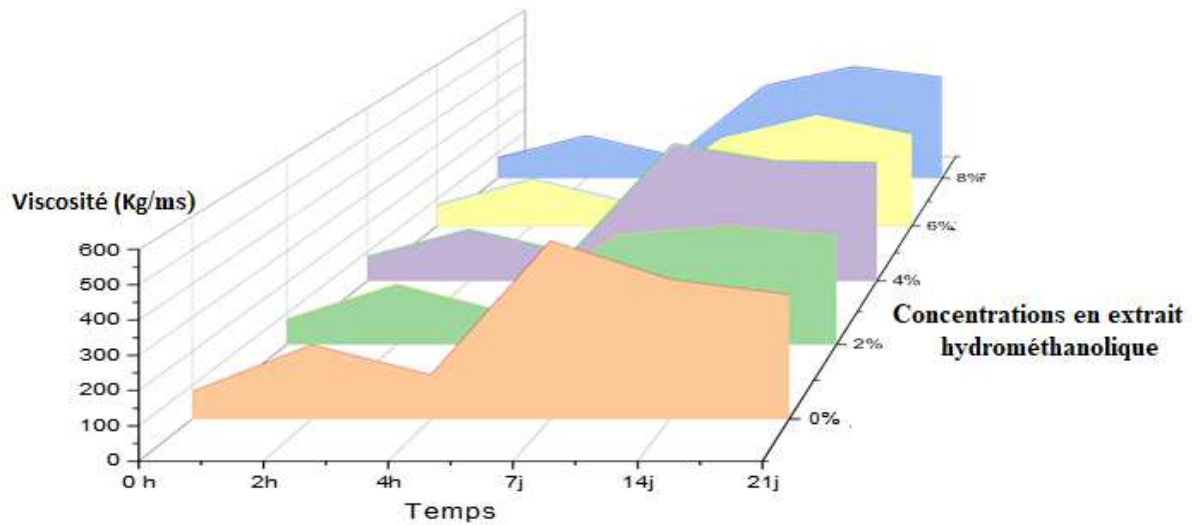


Figure 38. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris*

De la fin de la période de fermentation à la fin de la période de post-acidification, les laits fermentés à l'extrait aqueux de *T. vulgaris* ont présenté des valeurs de viscosité qui ont rehaussés de 55,86 à 272,82 Kg/ms, en moyenne (**Figure 39**).

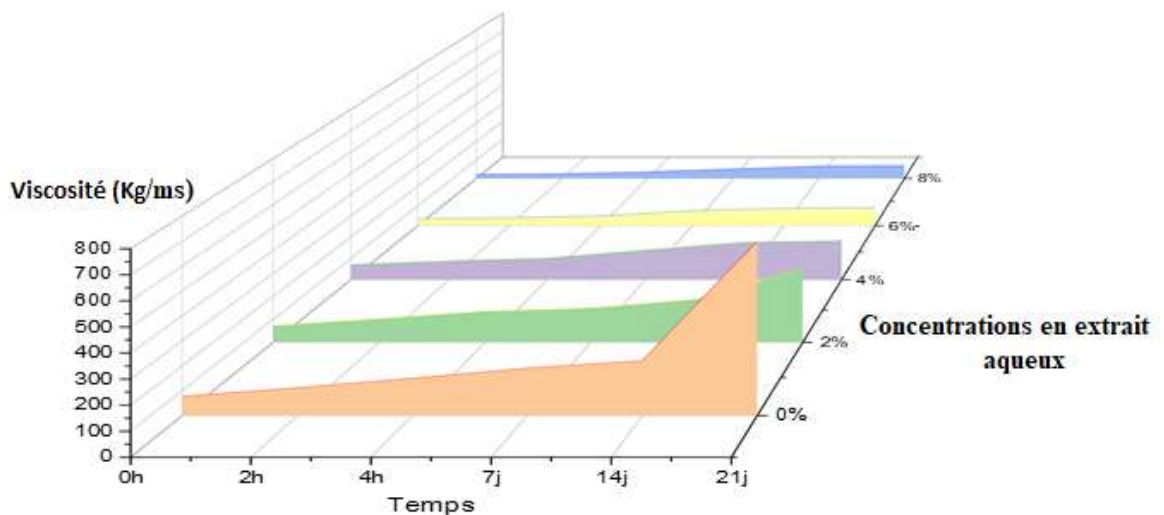


Figure 39. Evolution de la viscosité des yaourts additionnés de 0 à 8% d'extrait aqueux de *T. vulgaris*

Durant ces deux périodes d'essais, cette viscosité semble, toutefois, diminuer ($p < 0.05$) de 241,63 à 161,91 à 126,42 à 63,14 et à 44,77 Kg/ms, avec l'augmentation respective de 0, à 2, 4, 6 et 8% d'extrait aqueux de thym dans le yaourt.

1.2. Qualité microbiologique des yaourts étuvés enrichis en composés phénoliques

Les résultats du dénombrement des germes lactiques *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* dans les échantillons de yaourt additionnés d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* sont mentionnés dans les (Tableaux 16 et 17) ainsi que dans les (Figures 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46 et 47).

L'étude a révélé que quel que soit le solvant d'extraction utilisé, plus les taux d'incorporation des extraits de thym sont élevés plus le nombre des germes (*St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus*) est diminué sensiblement dans les yaourts expérimentaux. Les extraits de thym ajoutés dans les laits fermentés à de fortes doses de 6 et 8% semblent réduire remarquablement d'environ 57,84 à 63,07% le nombre des germes spécifiques du yaourt

1.2.1. *St. thermophilus*

Le nombre le plus élevé de *St. thermophilus* a été perçu dans le yaourt additionné d'extrait phénolique à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* au 14^{ème} jour de stockage (298×10^4 UFC/ml), tandis que les plus faibles résultats (13×10^4 UFC/ml) ont été obtenus aux 1^{ères} heures de stockage dans les yaourts additionnés d'extrait hydroéthanolique du végétal objet de l'étude.

Le nombre de *St. thermophilus* dans les produits additionnés d'extrait à l'hexane aqueux ont connu d'une façon globale une augmentation de 87×10^4 à 249×10^4 UFC/ml en moyenne de 0 heure jusqu'au 14^{ème} jour d'entreposage au froid à 4 °C, puis la prolifération du germe a diminué à 181×10^4 UFC/ml à la dernière semaine de conservation, au 21^{ème} jour (Figure 40).

De plus, une tendance inverse ($p < 0,01$) a été constatée entre le nombre de *St. thermophilus* et la concentration en extrait à l'hexane aqueux variable de 0, à 2, à 4, à 6 et à 8% ; soit des valeurs qui ont diminué respectivement de 198×10^4 à 190×10^4 à 175×10^4 à 153×10^4 et à $135,6 \times 10^4$ UFC/ml, en moyenne.

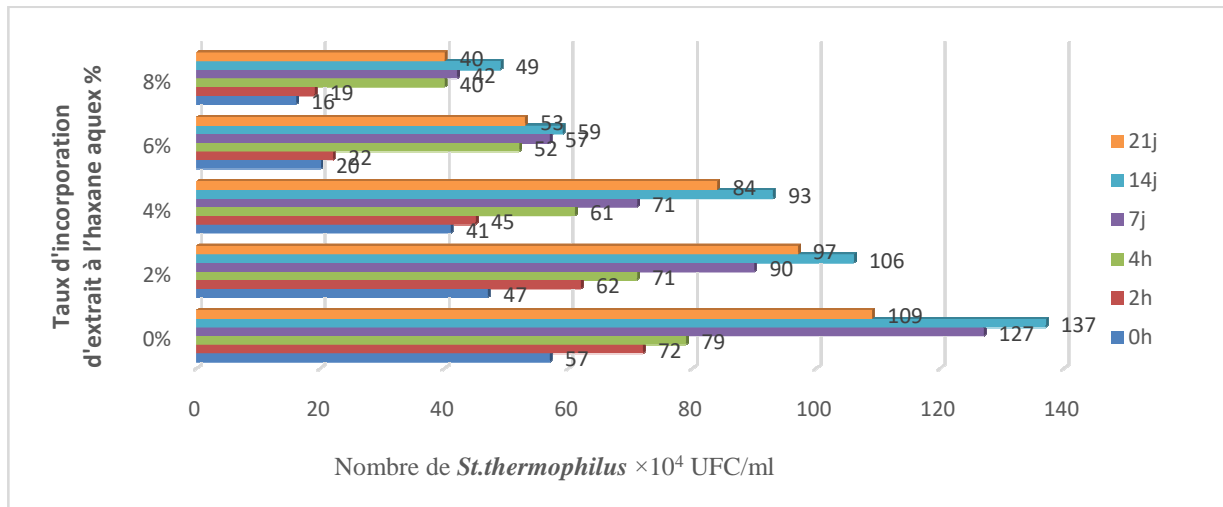


Figure 40 . Variation du nombre de *St. thermophilus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait à l'hexane aqueux de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Le nombre de *St. thermophilus* dans les produits additionnés d'extrait hydroéthanolique a accusé d'une façon globale une augmentation de 38×10^4 à 156×10^4 UFC/ml en moyenne de 0 heure jusqu'au 14^{ème} jour d'entreposage au froid à 4 °C, ensuite la croissance du germe a baissé à 108×10^4 UFC/ml au 21^{ème} jour d'entreposage au froid à 4°C (**Figure 41**).

Par ailleurs le nombre de *St. thermophilus* s'avère diminuer notablement ($p < 0.01$) de 162×10^4 à 117×10^4 à 71×10^4 à 51×10^4 et à 36×10^4 UFC/ml avec l'élévation de 0 à 2 à 4 à 6 et à 8% d'extrait hydroéthanolique de thym dans les produits expérimentaux.

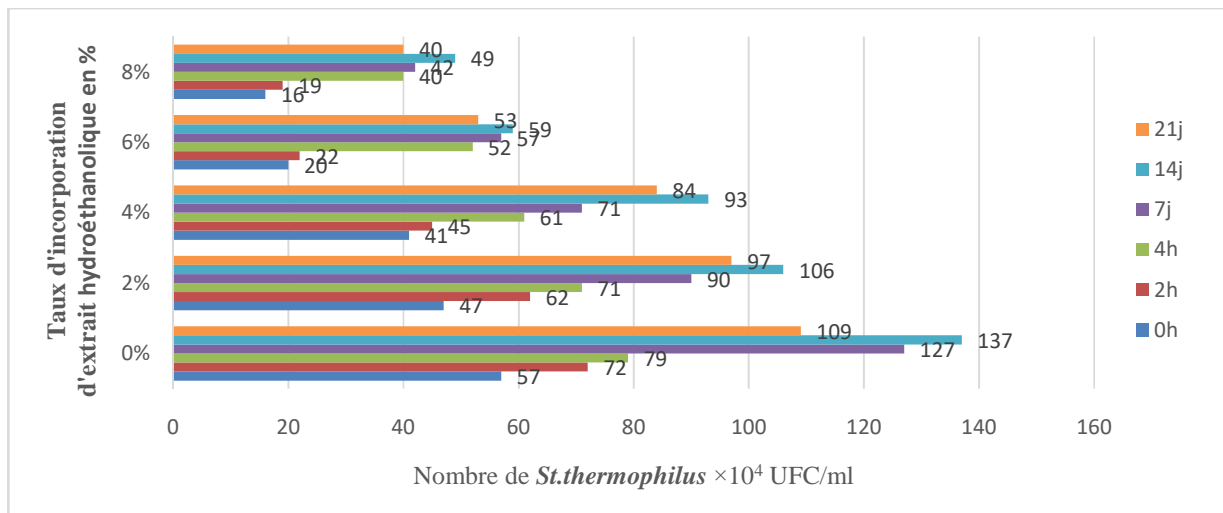


Figure 41 . Variation du nombre de *St.thermophilus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Quant au nombre de *St. thermophilus* dans les produits additionnés d'extrait hydrométhanolique, il a varié d'une façon globale de 24×10^4 à 177×10^4 UFC/ml en moyenne de 0 heure jusqu'au 14^{ème} jour pour diminuer à environ 81×10^4 UFC/ml au 21^{ème} jour de conservation (Figure 42).

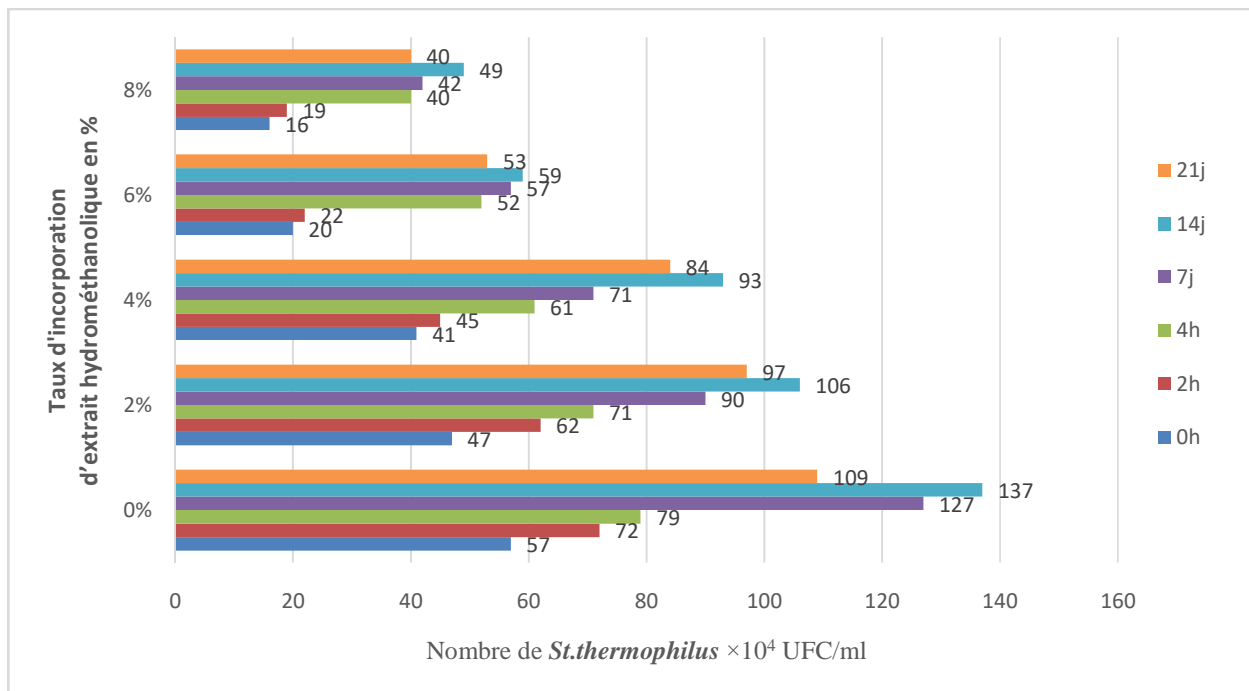


Figure 42. Variation du nombre de *St. thermophilus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydrométhanolique de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

L'analyse de variance montre des effets hautement significatifs ($p < 0.01$) des taux d'incorporation d'extrait hydrométhanolique de thym variables de (0, à 2, 4, 6 et 8%) sur les variations du nombre de *St.thermophilus* des yaourts au cours des périodes de fermentation et de post acidification ; avec un nombre de germes qui a diminué respectivement de 24×10^4 , à 25×10^4 , à 25×10^4 , à 22×10^4 et à 23×10^4 UFC/ml à 0 heure, de 45×10^4 , à 35×10^4 , à 30×10^4 , à 27×10^4 et à 25×10^4 UFC/ml après 02 heures, de 49×10^4 , à 45×10^4 à 40×10^4 , à 37×10^4 et à 33×10^4 UFC/ml à 4 heures, de 225×10^4 , à 50×10^4 à 52×10^4 , à 43×10^4 et à 36×10^4 UFC/ml au 7^{ème} jour, de 284×10^4 , à 242×10^4 à 134×10^4 , à 118×10^4 et à 108×10^4 UFC/ml au 14^{ème} jour, et de 156×10^4 , à 82×10^4 à 66×10^4 , à 56×10^4 et à 47×10^4 UFC/ml au jour 21 de stockage.

Concernant les yaourts enrichis en extrait aqueux de thym, au cours des deux périodes de fermentation et de post-acidification le germe *St.thermophilus* a marqué une prolifération appréciable de 36×10^4 à 155×10^4 UFC/ml en moyenne de 0heures jusqu'au 14^{ème} jour et une légère décroissance à 108×10^4 UFC/ml au 21^{ème} de stockage (**Figure 43**).

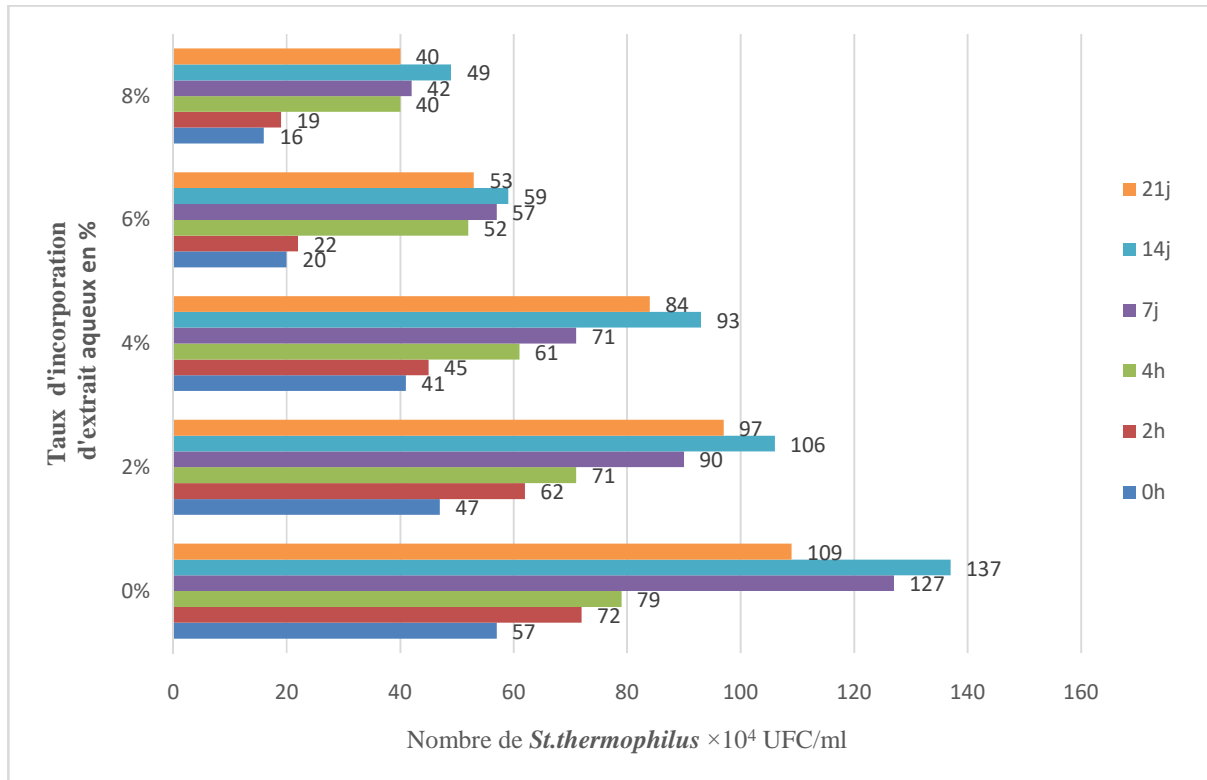


Figure 43. Variation du nombre de *St. thermophilus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait aqueux de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

L'analyse de variance dévoile des diminutions hautement significatifs ($p < 0.01$) du nombre de *St. thermophilus* en fonction de l'élévation de 0 à 8% des taux d'incorporation de l'extrait à l'eau dans les laits fermentés au cours des deux périodes d'essais de fermentation et de post-acidification ; avec des baisses de l'ordre de 34 % à 0 heure, de 27% à 2 heures, de 36% à 4heures, de 22% au 7^{ème} jour, de 23 % au 14^{ème} jour et de 19% au 21^{ème} jour.

Tableau 16. Variations du nombre de *St. thermophilus* ($\times 10^4$ UFC/ml) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de *T. vulgaris* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits dans le yaourt					Effet des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Fermentation	0h	88	89	80	90	87	p>0.05
	2h	99 ^{ab}	104 ^a	95 ^b	78 ^c	78 ^c	p<0.01
	4h	185 ^a	175 ^b	169 ^c	161 ^d	139 ^e	p<0.01
Post-acidification	7j	288 ^a	283 ^a	259 ^b	217 ^c	201 ^d	p<0.01
	14j	298 ^a	290 ^b	260 ^c	213 ^d	183 ^e	p<0.01
	21j	229 ^a	202 ^b	187 ^c	160 ^d	126 ^e	p<0.01
	Moy.	198	190	175	153	136	/
Extrait hydroéthanolique							
Fermentation	0h	64 ^a	44 ^b	38 ^{bc}	25 ^{bc}	17 ^c	p<0.01
	2h	87 ^a	44 ^b	36 ^b	15 ^c	13 ^c	p<0.01
	4h	108 ^a	62 ^b	59 ^b	40 ^b	37 ^b	p<0.01
Post-acidification	7j	230 ^a	185 ^b	86 ^c	68 ^c	50 ^c	p<0.01
	14j	278 ^a	233 ^b	118 ^c	88 ^d	63 ^e	p<0.01
	21j	206 ^a	137 ^b	89 ^c	70 ^c	38 ^d	p<0.01
	Moy.	162	117	71	51	36	/
Extrait hydrométhanolique							
Fermentation	0h	24 ^{ab}	25 ^a	25 ^a	22 ^c	23 ^b	p>0.05
	2h	45 ^a	35 ^b	30 ^c	27 ^d	25 ^e	p<0.01
	4h	49 ^a	45 ^b	40 ^c	37 ^d	33 ^e	p<0.01
Post-acidification	7j	225 ^a	50 ^b	52 ^b	43 ^c	36 ^c	p<0.01
	14j	284 ^a	242 ^b	134 ^c	118 ^d	108 ^e	p<0.01
	21j	156 ^a	82 ^b	66 ^c	56 ^d	47 ^e	p<0.01
	Moy.	130	80	58	50	45	/
Extrait aqueux							
Fermentation	0h	53 ^a	43 ^a	39 ^{ab}	25 ^b	18 ^c	p<0.01
	2h	85 ^a	45 ^b	42 ^b	30 ^b	23 ^c	p<0.01
	4h	102 ^a	62 ^b	60 ^b	40 ^c	37 ^c	p<0.01
Post-acidification	7j	230 ^a	187 ^b	86 ^c	69 ^c	50 ^c	p<0.01
	14j	278 ^a	233 ^b	115 ^c	86 ^d	63 ^e	p<0.01
	21j	206 ^a	137 ^b	90 ^c	70 ^c	39 ^d	p<0.01
	Moy.	159	118	72	53	38	/

h : heures ; j : Jours ; Moy. : valeur moyenne ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls ; UFC : unité formant colonie ; ml : millilitre.

1.2.2. *Lb. bulgaricus* :

Durant les périodes de fermentation et de post-acidification le nombre de *Lb. bulgaricus* dans le yaourt additionné d'extrait à l'hexane aqueux de thym a augmenté de 14×10^4 à 111×10^4

UFC/ml en moyenne de 0 heure jusqu'au 14^{ème} jour de stockage au froid à 4 °C, ensuite le nombre du germe lactique a baissé pour atteindre la valeur de 82×10^4 UFC/ml au 21^{jour} de conservation. Au cours de ces deux périodes d'étude, il a été constaté une évolution inversement proportionnelle entre le nombre de *Lb. bulgaricus* et l'élévation des taux d'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* dans les produits ($p < 0.01$) ; soit des baisses du nombre de germes de 86×10^4 à 75×10^4 à $64,5 \times 10^4$ à 53×10^4 et à 38×10^4 UFC/ml, en moyenne pour les taux d'extrait ajoutés variables de 0, à 2, à 4, à 6 et à 8% respectivement, dans les yaourts expérimentaux (**Figure 44**).

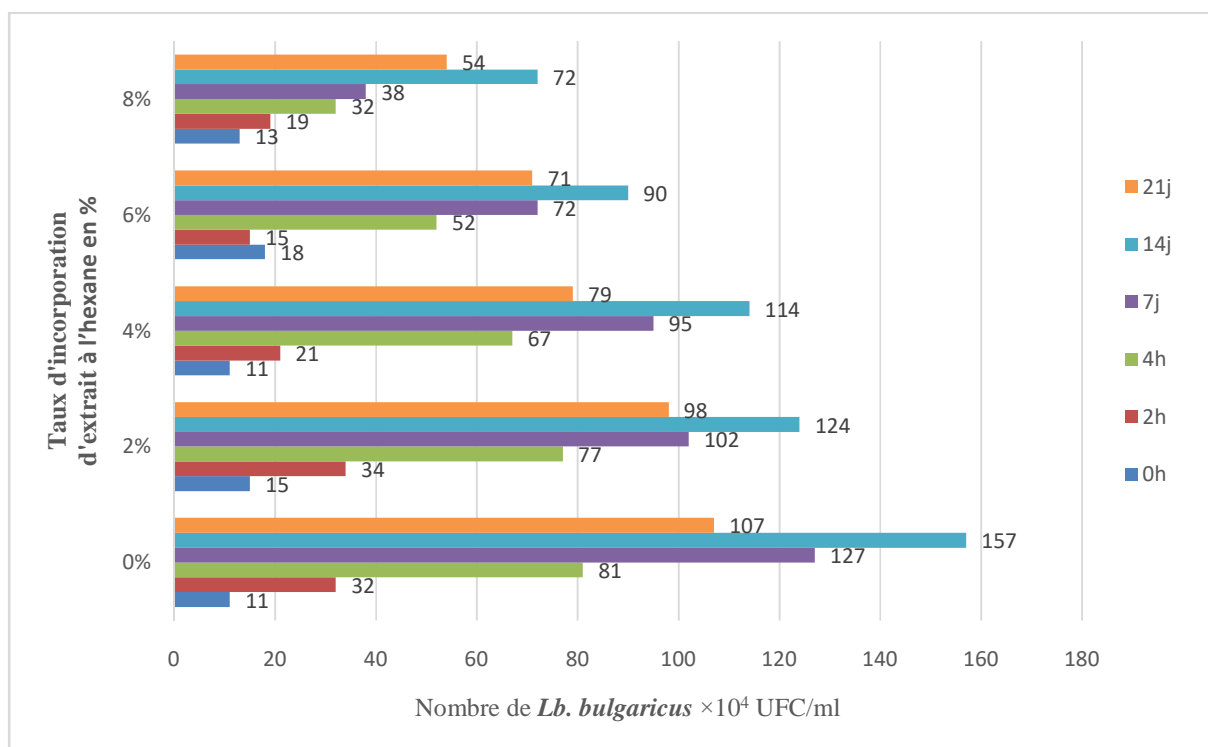


Figure 44 . Variation du nombre de *Lb. bulgaricus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait à l'hexane aqueux de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Concernant les germes *Lb.bulgaricus* dans les yaourts additionnés d'extrait hydroéthanolique le nombre a évolué de 36×10^4 à 88×10^4 UFC/ml en moyenne de 0 heure jusqu'au 14^{ème} jour pour décroître ensuite à 79×10^4 UFC/ml en fin de l'expérimentation au 21^{ème} jour. Des diminutions hautement significatifs ($p < 0.01$) du nombre de *Lb. bulgaricus* en fonction de l'élévation de 0 à 8% des taux d'incorporation de l'extrait hydroéthanolique dans les laits fermentés ont été constatées au cours des deux périodes d'essais de fermentation et de post-

acidification; soit des baisses de l'ordre de 30% à 0 heure, de 20 % à 2 heures, de 50 % à 4heures, de 32% au 7^{ème} jour, de 35% au 14^{ème} jour et de 40% au 21^{ème} jour (**Figure 45**).

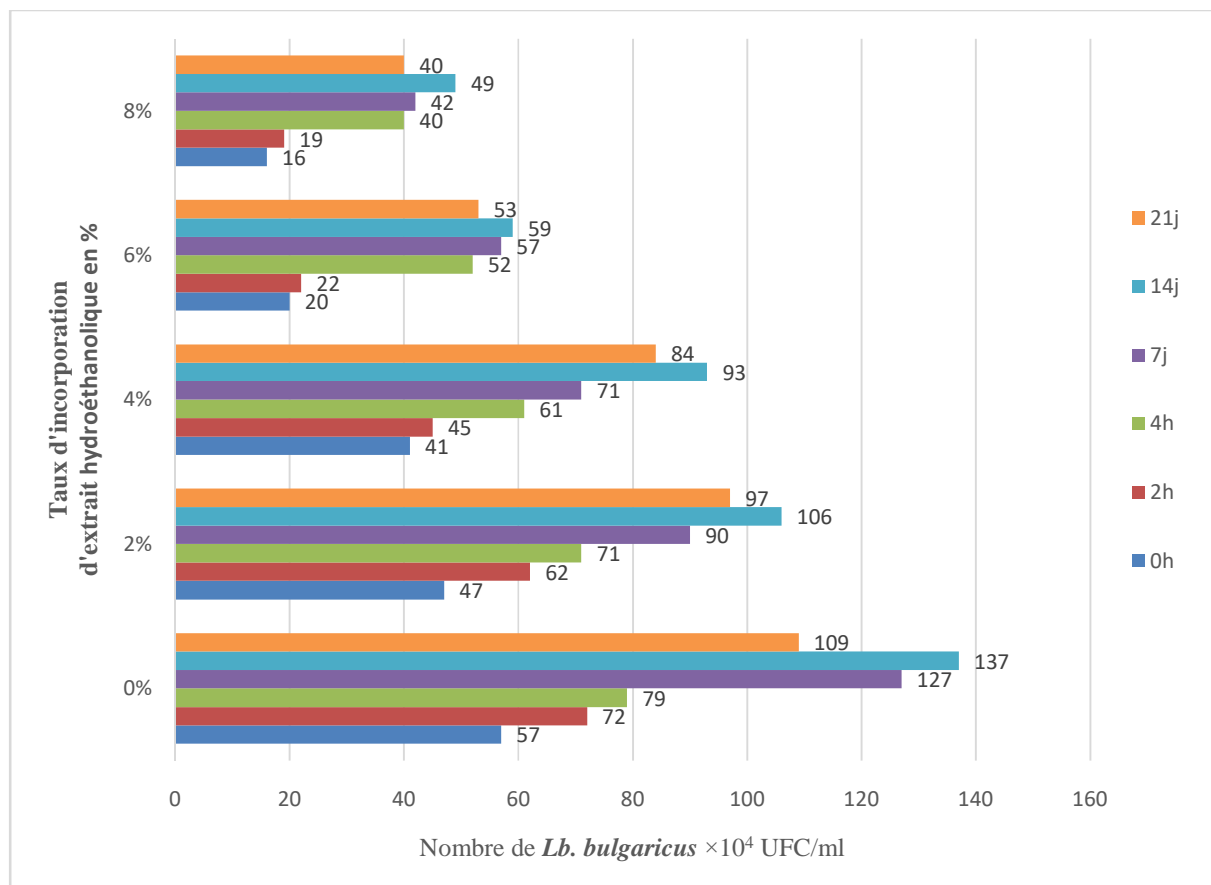


Figure 45. Variation du nombre de *Lb. bulgaricus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydroéthanolique de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Dans les yaourts enrichis en extrait hydrométhanolique les germes *Lb bulgaricus* ont révélé une prolifération notable de 16×10^4 à 44×10^4 UFC/ml en moyenne de 0h de fermentation au 14^{ème} jour de la période de post-acidification et d'une diminution à 29×10^4 UFC/ml à la fin d'entreposage des produits au 21^{ème} jour. Par ailleurs, le nombre en ce germe s'avère diminuer considérablement ($p < 0.01$) de 51×10^4 à 33×10^4 à 25×10^4 à 21×10^4 et à 19×10^4 UFC/ml avec l'élévation de 0 à 2 à 4 à 6 et à 8% d'extrait hydrométhanolique de thym (**Figure 46**).

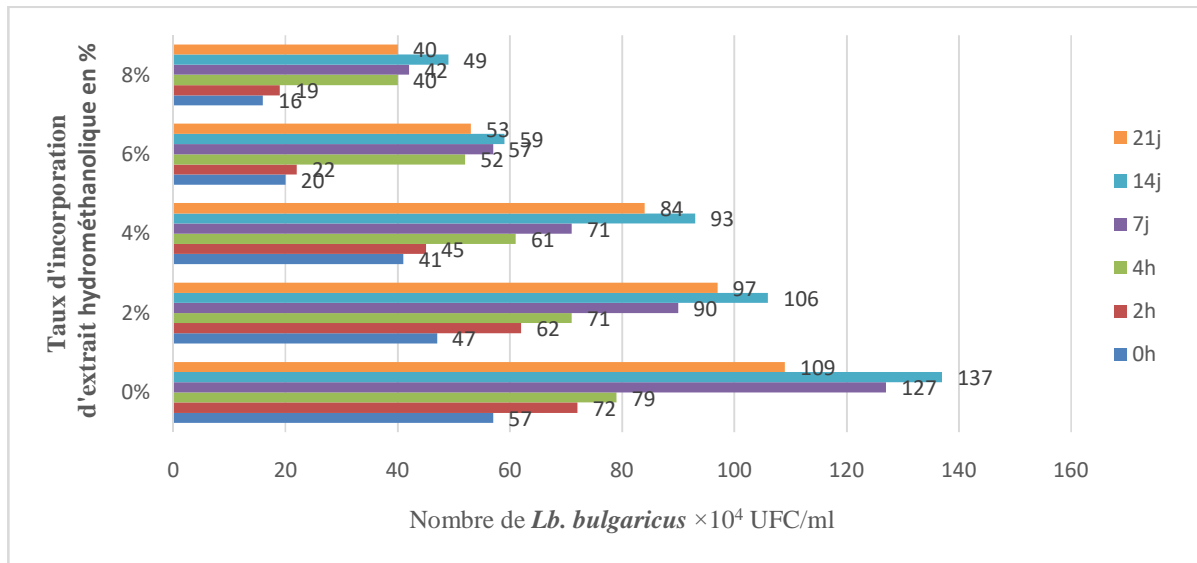


Figure 46. Variation du nombre de *Lb. bulgaricus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait hydrométhanolique de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Quant aux yaourts enrichis en extrait aqueux de thym, la croissance moyenne de *Lb.bulgaricus* est passée de 35×10^4 à 89×10^4 UFC/ml du début de fermentation au 14^{ème} jour de post acidification, suivi d'une décroissance à environ 77×10^4 UFC/ml à la fin d'entreposage au 21^{ème} jour (**Figure 47**).

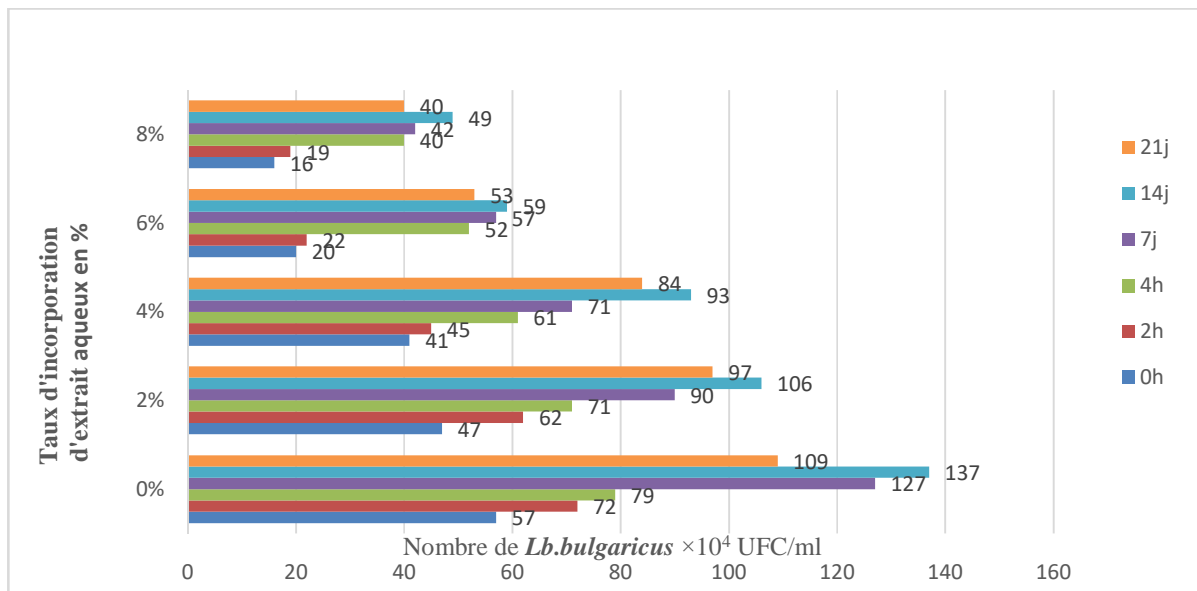


Figure 47. Variation du nombre de *Lb.bulgaricus* dans les yaourts enrichis à différentes concentrations d'extrait aqueux de *T.vulgaris* durant les périodes de fermentation et de stockage au froid à 4 °C.

Par ailleurs, la croissance du germe semble d'autant plus altérée que le yaourt est enrichi en extrait aqueux de la plante ($p < 0.01$) ; soit des baisses d'environ de 28 % à 0 heure, de 26 % à 2 heures, de 50 % à 4 heures, de 24 % au 7^{ème} jour, de 36% au 14^{ème} jour et de 37% au 21^{ème} jour de la croissance bactérienne dans les laits fermentés additionnés d'extrait de thym par rapport au témoin .

Tableau 17. Variations du nombre de *Lb. bulgaricus* ($\times 10^4$ UFC/ml) des yaourts additionnés d'extraits aux solvants aqueux à différentes polarités de *T. vulgaris* au cours des périodes de fermentation et de post-acidification.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effet des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Fermentation	0h	11	15	11	18	13	P>0.05
	2h	32 ^a	34 ^a	21 ^b	15 ^b	19 ^b	P<0.01
	4h	81 ^a	77 ^a	67 ^b	52 ^c	32 ^d	P<0.01
Post-acidification	7j	127 ^a	102 ^b	95 ^b	72 ^c	38 ^d	P<0.01
	14j	157 ^a	124 ^b	114 ^b	90 ^c	72 ^d	P<0.01
	21j	107 ^a	98 ^a	79 ^b	71 ^b	54 ^c	P<0.01
	Moy.	86	75	64	53	38	/
Extrait hydroéthanolique							
Fermentation	0h	57 ^a	47 ^{ab}	41 ^b	20 ^c	17 ^c	P<0.01
	2h	97 ^a	62 ^b	36 ^c	22 ^c	19 ^c	P<0.01
	4h	78 ^a	78 ^a	54 ^b	52 ^b	39 ^c	P<0.01
Post-acidification	7j	127 ^a	89 ^b	70 ^{bc}	55 ^{bc}	41 ^c	P<0.01
	14j	136 ^a	106 ^b	93 ^b	58 ^c	48 ^c	P<0.01
	21j	109 ^a	97 ^a	83 ^b	63 ^c	44 ^d	P<0.01
	Moy.	101	80	63	45	35	/
Extrait hydrométhanolique							
Fermentation	0h	22 ^a	18 ^b	18 ^b	10 ^c	10 ^c	P>0.05
	2h	35 ^a	22 ^b	20 ^c	20 ^c	18 ^d	P<0.01
	4h	45 ^a	35 ^b	28 ^c	26 ^d	23 ^e	P<0.01
Post-acidification	7j	61 ^a	41 ^b	31 ^c	26 ^d	22 ^e	P<0.01
	14j	75 ^a	45 ^b	38 ^c	34 ^d	30 ^e	P<0.01
	21j	68 ^a	38 ^b	17 ^c	13 ^d	10 ^e	P<0.01
	Moy.	51	33	25	21	19	/
Extrait aqueux							
Fermentation	0h	57 ^a	47 ^{ab}	41 ^b	20 ^c	16 ^c	P<0.01
	2h	72 ^a	62 ^a	45 ^b	22 ^c	19 ^c	P<0.01
	4h	79 ^a	71 ^a	61 ^b	52 ^c	40 ^c	P<0.01
Post-acidification	7j	127 ^a	90 ^b	71 ^{bc}	57 ^{bc}	42 ^c	P<0.01
	14j	137 ^a	106 ^b	93 ^b	59 ^c	49 ^c	P<0.01
	21j	109 ^a	97 ^{ab}	84 ^b	53 ^c	40 ^d	P<0.01
	Moy.	97	79	66	44	34	/

h : heures ; j : Jours; Moy. : valeur moyenne ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls ; UFC : unité formant colonie ; ml : millilitre

1.3. Qualité organoleptique des yaourts étuvés enrichi en composés phénoliques

Les résultats de l'évaluation sensorielle des yaourts préparés avec les différents extraits de *T. vulgaris* pendant la période de post-acidification sont illustrés dans les (Tableaux 18, 19, 20, 21, 22, 23 et 24).

Globalement, des différences significatives dans l'apparence, la saveur, la texture, la consistance et l'acceptabilité ont été observées entre l'échantillon contrôle (0% d'extrait) et ceux des yaourts additionnés d'extraits de thym à 6 et 8%. Néanmoins, les yaourts enrichis jusqu'à 4% d'extraits de *T. vulgaris* ont présenté une qualité organoleptique similaire au témoin.

L'augmentation de la dose de fortification en extraits riches en composés *T. vulgaris* au-delà de 4% dans les laits fermentés a démontré une nette altération des critères sensoriels caractéristiques d'un yaourt ferme type étuvé.

1.3.1. Goût acide

Durant la période de post-acidification, le yaourt témoin a été classé au dernier rang du point de vue goût acide avec une moyenne des sommes des rangs de 39,75 par rapport aux autres essais expérimentaux à base d'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris* qui ont marqué d'après les dégustateurs, une relative augmentation ($p < 0.05$) de l'acidité ; avec une somme des rangs en moyenne de 30,12 et de 16,5 pour, respectivement, les produits préparés à 4 et 8% d'extrait de thym.

En ce qui concerne les yaourts enrichis en extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris*, les dégustateurs ont classé au premier rang l'acidité du yaourt témoin préparé sans extrait par rapport aux autres essais expérimentaux. Pendant toute la période de post-acidification, le goût acide a tendance à diminué avec l'augmentation de la dose de thym dans les produits ; soit des moyennes de somme des rangs qui ont varié de 11, à 20, à 30, à 42 et à 45 pour les doses d'extrait incorporés de 0, 2, 4, 6 et 8%, successivement.

Concernant les yaourts enrichis d'extrait hydrométhanolique de thym, les panelistes n'ont pas trouvé de différences significatives ($p > 0.05$) d'acidité entre les produits expérimentaux ; 32,5 à 24,9 sommes des rangs, en moyenne. Toutefois, au 21^{ème} jour de conservation, les échantillons

préparés à 6 et 8% (14 et 12 sommes des rangs) ont été mieux appréciés que le témoin (37,5 sommes des rangs).

Pour les yaourts fortifiés par l'extrait aqueux de *T. vulgaris*, les dégustateurs ont classé au premier rang le goût acide du yaourt témoin préparé sans extrait à l'eau de thym par rapport aux autres essais expérimentaux qui ont noté une acidité moins prononcée avec l'augmentation de la concentration d'extrait dans les produits préparés au cours de toute la période de conservation au froid à 4°C (Tableau 18).

Tableau 18. Variation sensorielle du goût acide (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	33,5 ^{ab}	43,5 ^a	29 ^b	21 ^b	23 ^b	p<0.01
	7j	37,5 ^a	40,5 ^a	34 ^a	22,5 ^b	12,5 ^c	p<0.01
	14j	42,5 ^a	42 ^a	27 ^b	24 ^b	14,5 ^c	p<0.01
	21j	45,5 ^a	40 ^a	30,5 ^b	18 ^c	16 ^c	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	10 ^e	21 ^d	33,5 ^c	40,5 ^b	45 ^a	p<0.01
	7j	14 ^d	20,5 ^c	30 ^b	41 ^a	45 ^a	p<0.01
	14j	10 ^d	20 ^c	30 ^b	44,5 ^a	45,5 ^a	p<0.01
	21j	11,5 ^e	18,5 ^d	30 ^c	42 ^b	48 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	34 ^a	36,5 ^a	26,5 ^b	32,5 ^a	33 ^a	p<0.05
	7j	19,5 ^b	26,5 ^a	22,5 ^b	25 ^a	26,5 ^a	p<0.05
	14j	23,5 ^b	23 ^b	30,5 ^a	25,5 ^b	22 ^b	p<0.01
	21j	37,5 ^a	31 ^b	23 ^b	14 ^c	12 ^c	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	13 ^e	21,5 ^d	27,5 ^c	39,5 ^b	49 ^a	p<0.01
	7j	13 ^d	23 ^c	27 ^c	40,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	14j	13,5 ^d	19,5 ^c	30 ^b	44 ^a	44,5 ^a	p<0.01
	21j	11,5 ^e	22,5 ^d	29 ^c	39,5 ^b	44,5 ^a	p<0.01

j : Jours; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

1.3.2. Goût de fraîcheur

Au cours de la période de conservation, les dégustateurs ont bien apprécié le goût de fraîcheur des laits fermentés additionnés d'extrait à l'hexane aqueux de *T. vulgaris*, dont les

meilleurs résultats ont été enregistrés dans les échantillons préparés à 2 et 4% d'extrait de thym ; avec des moyennes de somme des rangs de 19,87 et 21,12, successivement par rapport aux autres essais préparés à 6 et 8% qui ont accusé 35,12 et 44,12 sommes des rangs, en moyenne, respectivement (**Tableau 19**).

Tableau 19. Variation sensorielle du goût de fraîcheur (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	33,5 ^b	19 ^c	13,5 ^c	38 ^b	46 ^a	p<0.01
	7j	40,5 ^a	21,5 ^b	19 ^b	28,5 ^b	41,5 ^a	p<0.01
	14j	30a ^b	21 ^b	22,5 ^b	33,5 ^{ab}	43 ^a	p<0.01
	21j	16 ^c	18 ^c	29,5 ^b	40,5 ^a	46 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	10 ^d	22,5 ^c	34,5 ^b	39,5 ^a	43,5 ^a	p<0.01
	7j	18 ^b	28 ^{ab}	27 ^{ab}	34 ^a	42 ^a	p<0.01
	14j	11,5 ^d	11,5 ^d	18,5 ^c	46 ^a	44 ^a	p<0.01
	21j	12 ^e	18,5 ^d	29,5 ^c	50 ^a	50 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	8,5 ^e	16 ^d	24 ^b	28,5 ^b	40 ^a	p<0.01
	7j	16,5 ^c	18 ^c	26 ^b	29,5 ^a	29 ^a	p<0.01
	14j	10,5 ^e	15,5 ^d	22,5 ^c	33,5 ^b	38 ^a	p<0.01
	21j	10 ^e	16,5 ^d	22 ^c	32 ^b	39,5 ^a	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	13 ^c	19 ^b	32,5 ^a	32,5 ^a	32,5 ^a	p<0.01
	7j	13 ^e	19 ^b	31,5 ^c	40 ^a	46,5 ^a	p<0.01
	14j	13 ^e	21 ^d	30 ^c	38 ^b	47 ^a	p<0.01
	21j	11 ^e	22 ^d	31,5 ^c	38,5 ^b	47 ^a	p<0.01

j : Jours ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

Les meilleurs résultats du goût de fraîcheur ont été constatées dans les essais préparés à 0 et 2% d'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* (p<0,01) (12,88 et 21,88, somme des rangs, en moyenne) contrairement à ceux préparés à des taux supérieurs à 4, 6 et 8% qui ont dévoilé de médiocres résultats ; 27,37, 42,37 et 44,88 sommes des rangs, en moyenne, respectivement.

Du début jusqu'à la fin de la conservation au 21^{ème} jour, la sensation de fraîcheur semble être altérée ($p < 0.01$) chez les panelistes avec l'augmentation de 0 à 8% d'extrait hydrométhanolique de thym dans les produits expérimentaux ; soit une augmentation des valeurs de somme des rangs de 11,38, à 36,62, en moyenne.

Enfin, une perte remarquable ($p < 0.01$) de la sensation de fraîcheur avec l'augmentation de 0 à 8% d'extrait aqueux de thym dans le yaourt a été appréciée par le jury de dégustation durant toute la période de l'étude ; avec une élévation de la somme des rangs de 12,5 à 43,33, en moyenne.

1.3.3. Cohésivité :

Durant toute la période de post-acidification, la cohésivité a tendance à diminuer avec l'augmentation de 0 à 8% de la dose d'extrait à l'hexane aqueux de thym incorporées dans le yaourt ($p < 0.01$) ; soit des moyennes de sommes des rangs qui ont varié de 16,12 à 49,25.

Quant aux laits fermentés additionnés d'extrait hydroéthanolique de thym, les dégustateurs ont qualifié la cohésivité du témoin de meilleur comparativement aux autres produits expérimentaux ($p < 0.01$) ; 14,25 sommes des rangs en moyenne contre 20,8, 30,12, 40 et 45,75 et pour les échantillons préparés à 2, 4, 6 et 8% d'extrait de la plante. Apparemment, les meilleurs résultats de cohésivité ont été enregistrés dans les échantillons concentrés à 0, 2 et 4%.

Au 1^{er}, comme au 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour de post-acidification la cohésivité des laits fermentés s'avère d'autant plus diminuée ($p < 0.01$) en fonction de l'augmentation de 0, à 2, à 4, à 6, et à 8% du taux d'incorporation d'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* dans le yaourt ; avec des valeurs de somme des rangs de 10,38, 16,38, 24,63, 32 et 35,88, en moyenne, respectivement, durant toute la période expérimentale.

Concernant l'extrait à l'eau, pendant l'expérimentation, le témoin a été le mieux classé ($p < 0.01$) au plan de la cohésivité par les dégustateurs que les autres échantillons expérimentaux ; avec une moyenne de somme des rangs de 13,3 contre 19,3, 28,5, 42,13 et 46,63 sommes des rangs, en moyenne pour les essais concentrés à 2, 4, 6 et 8% en cet extrait aqueux de thym (Tableau 20).

Tableau 20. Variation sensorielle de la cohésivité (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hydrohexanique							
Post-acidification	1j	19,5 ^d	16 ^d	27 ^c	37,5 ^d	50 ^a	p<0.01
	7j	15,5 ^d	18,5 ^d	26 ^c	41 ^b	49 ^a	p<0.01
	14j	15 ^d	18,5 ^d	28,5 ^c	38,5 ^b	49,5 ^a	p<0.01
	21j	14,5 ^d	19 ^d	29 ^c	39,5 ^b	48,5 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	10 ^a	20,5 ^c	32,5 ^b	43,5 ^a	43,5 ^a	p<0.01
	7j	24 ^b	25,5 ^b	26,5 ^b	33 ^b	45 ^a	p<0.01
	14j	12,5 ^d	17,5 ^c	32 ^b	44 ^a	45 ^a	p<0.01
	21j	10,5 ^e	20 ^d	29,5 ^c	39,5 ^b	49,5 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	11,5 ^d	12,5 ^d	25,5 ^c	31,5 ^b	39 ^a	p<0.01
	7j	13 ^c	18,5 ^{bc}	27 ^{ab}	31,5 ^a	27 ^{ab}	p<0.01
	14j	9 ^e	15,5 ^d	25 ^c	30,5 ^b	40 ^a	p<0.01
	21j	8 ^c	19 ^b	21 ^b	34,5 ^a	37,5 ^a	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	14 ^e	18,5 ^d	27,5 ^c	40 ^b	50 ^a	p<0.01
	7j	13,5 ^d	19 ^c	28 ^b	43 ^a	45,5 ^a	p<0.01
	14j	13 ^e	19,5 ^d	28,5 ^c	42 ^b	47 ^a	p<0.01
	21j	12,5 ^d	19,5 ^c	30,5 ^b	43,5 ^a	44 ^a	p<0.01

j : Jours; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

1.3.4. Adhésivité

Au cours de toute la phase de conservation les dégustateurs ont qualifié l'adhésivité du témoin de meilleure (p<0.01) par rapport aux autres échantillons fermentés additionnés d'extrait à l'hexane aqueux de thym à 2, 4, 6 et 8% ; 14 vs 19 vs 26.75 vs 41.5 vs 48, somme des rangs, en moyenne (**Tableau 21**).

Tableau 21. Variation sensorielle de l'adhésivité (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des doses d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	13 ^e	19 ^d	26,5 ^c	42 ^b	48 ^a	p<0.01
	7j	16,5 ^d	18,5 ^d	24 ^c	41 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	14j	12 ^e	21,5 ^d	27,5 ^c	40 ^b	49 ^a	p<0.01
	21j	14,5 ^d	17 ^d	29 ^c	43 ^b	46,5 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	10,5 ^d	19,5 ^c	34,5 ^b	42,5 ^a	43 ^a	p<0.01
	7j	24,5 ^c	20,5 ^c	30,5 ^c	34,5 ^b	44,5 ^a	p<0.01
	14j	14,5 ^d	15,5 ^d	30 ^c	43,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	21j	10,5 ^e	20 ^d	29,5 ^c	42 ^b	49 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	9 ^e	16,5 ^d	25 ^c	31 ^b	39,5 ^a	p<0.01
	7j	16 ^c	20 ^b	27,50 ^a	27 ^a	29,5 ^a	p<0.01
	14j	14 ^d	15,5 ^d	23 ^c	31,5 ^b	39 ^a	p<0.01
	21j	8,50 ^d	17,5 ^c	27 ^b	30,5 ^b	36,5 ^a	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	12,5 ^e	20,5 ^d	29 ^c	41 ^b	47 ^a	p<0.01
	7j	12 ^e	20,5 ^d	32 ^c	37 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	14j	12 ^e	20,5 ^d	32 ^c	37 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	21j	16,5 ^d	18,5 ^d	24 ^c	41 ^b	48,5 ^a	p<0.01

j : Jours ; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls

En ce qui concerne les yaourts enrichis en extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris*, pendant toute la période de post-acidification, l'adhésivité a diminué significativement (p<0.01) de 15 à 18.88 à 31.12 à 40.62 et à 45.75 sommes des rangs, en moyenne avec l'augmentation successive de 0 à 2 à 4 à 6 et à 8% de la quantité d'extrait de la plante incorporé dans le produit.

Durant cette même période de conservation au froid pendant 21 jour, l'adhésivité s'est avérée nettement plus altérée (p<0.01) avec l'élévation du taux d'incorporation de 0 à 2, 4, 6 et 8% d'extrait hydrométhanolique de thym dans le yaourt ; 11,8vs17.38vs 25,62vs 30vs36,13 sommes des rangs, en moyenne, respectivement.

Enfin, les dégustateurs ont décelé également au cours de l'essai une relation inversement proportionnelle entre l'adhésivité et les taux d'extrait aqueux de thym (de 0, 2, 4, 6 et 8%) ajoutés dans le yaourt (p<0.01) ; 13,25 vs 20 vs 29,25 vs 39 vs 48,13 vs somme des rangs, en moyenne.

1.3.5. Odeur

D'après le jury de dégustation, durant les 21 jours de conservation au froid à 4°C les laits fermentés préparés à 2 et 4% d'extrait à l'hexane aqueux de thym ont accusé les meilleurs scores à l'odorat par rapport aux autres essais expérimentaux ; 19,25 et 21,62 sommes des rangs, en moyenne contre 35,75 et 47,25 pour les doses d'extrait de 6 et 8%, respectivement.

En revanche, parmi l'ensemble des yaourts fortifiés d'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris*, le témoin sans extrait a enregistré la meilleure sensation à l'odorat durant toute cette période de l'étude. Apparemment, plus le taux d'incorporation de l'extrait à l'éthanol aqueux de thym est élevé plus les produits sont moins bien appréciés par les dégustateurs ($p < 0,01$) ; la différence de notation a augmenté de 12,38 pour le témoin à plus de 45 sommes des rangs, en moyenne pour l'échantillon préparé à 8% d'extrait hydroéthanolique de thym.

À propos des yaourts enrichis d'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris* à différentes concentrations, la sensation à l'odorat s'est avérée d'autant plus accentuée ($p < 0,01$) que la quantité en cet extrait ajoutée est augmentée de 2, à 4, à 6 et à 8% dans les produits expérimentaux ; 11,63, 19,13, 24,13, 31,25 et 35,5 sommes des rangs, en moyenne, respectivement.

L'incorporation d'extrait aqueux de thym de 0, à 2, 4, 6, et 8% au yaourt semble altérer d'une manière proportionnelle l'odeur des produits ($p < 0,01$); soit des élévations de la somme des rangs de 10,88, à 21,33, à 30,88, à 39,88 et à 47,5 en moyenne, respectivement, durant toute la période de post-acidification. L'odeur du témoin reste plus ou moins plus acceptable chez les panelistes que celle des autres produits expérimentaux fortifiés d'extrait aqueux de thym surtout au 14^{ème} jour de conservation (**Tableau 22**).

1.3.6. Arrière-goût

Pendant la période de conservation, l'échantillon témoin a été le mieux classé par les dégustateurs au plan de l'arrière-goût que les yaourts expérimentaux additionnés d'extrait à l'hexane aqueux de thym incorporé à 2, 4, 6 et 8% ; 16,63 vs 21 vs 25,75 vs 39,75 vs 46,88 somme des rangs, en moyenne. Cependant, l'essai préparé à 2 et 4% s'avère proche du témoin 16.63 vs 21 et 25.75 sommes des rangs, en moyenne.

Tableau 22. Variation sensorielle de l'odeur (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	36 ^b	16 ^c	16,5 ^c	32 ^b	48 ^a	p<0.01
	7j	33,5 ^a	20 ^b	18 ^b	33,5 ^a	45 ^a	p<0.01
	14j	17 ^c	24 ^c	21 ^c	39,5 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	21j	14,5 ^d	17 ^d	31 ^c	38 ^b	47,5 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	11,5 ^d	20,5 ^c	34,5 ^b	38,5 ^b	44 ^a	p<0.01
	7j	13,5 ^e	23 ^d	30 ^c	39 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	14j	12,5 ^d	18 ^c	30 ^b	43,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	21j	12 ^e	18 ^d	31 ^c	40,5 ^b	49 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	9,50 ^e	17,5 ^d	23,50 ^c	32,5 ^b	39 ^a	p<0.01
	7j	14 ^b	22 ^{ab}	28,50 ^a	30,50 ^a	29,5 ^a	p<0.01
	14j	8,50 ^d	18,5 ^c	21,50 ^c	32 ^b	39,5 ^a	p<0.01
	21j	14,5 ^c	18,5 ^{bc}	23 ^{abc}	30 ^{ab}	34 ^a	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	11,5 ^e	21 ^d	31,5 ^c	40 ^b	48 ^a	p<0.01
	7j	10,5 ^e	20,5 ^d	32 ^c	40,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	14j	10,5 ^e	20,5 ^d	32 ^c	40,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	21j	11 ^e	23,5 ^d	28 ^c	38,5 ^b	49 ^a	p<0.01

j : Jours; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls.

Aussi, pendant toute la phase de post-acidification le yaourt témoin a été nettement le plus apprécié par les panelistes que les laits fermentés additionnés d'extrait hydroéthanolique de thym à 2, 4, 6 et 8% ; 12, 33 vs 18,75 vs 32,33 vs 41,25 vs 45,75 vs, somme des rangs, en moyenne.

Quant aux yaourts supplémentés d'extrait hydrométhanolique de *T. vulgaris*, la sensation d'arrière-goût s'est avérée d'autant plus accentuée (p<0.01) que la quantité en cet extrait ajoutée est augmentée de 2, à 4, à 6 et à 8% dans les produits expérimentaux ; 10,88, 16,38, 24,63, 31,38 et 36,5 sommes des rangs, en moyenne, respectivement.

Enfin, le yaourt contrôle s'est également démarqué par un meilleur score (p<0.01) du point de vue de l'arrière-goût que les autres essais additionnés d'extrait aqueux de thym

notamment à de fortes concentrations de 6 et 8% ; 11,25 vs 39 vs 47,25 somme des rangs, en moyenne (Tableau 23).

Tableau 23. Variation sensorielle de l'arrière-goût (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	19,5 ^b	18,5 ^b	22,5 ^b	42 ^a	47,5 ^a	p<0.01
	7j	18 ^c	21,5 ^c	26,5 ^c	37,5 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	14j	16,5 ^d	20,5 ^{cd}	25 ^c	39,5 ^b	48,5 ^a	p<0.01
	21j	12,5 ^c	23,5 ^b	29 ^b	40 ^a	45 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	11 ^d	20,5 ^c	34 ^b	41,5 ^a	44,5 ^a	p<0.01
	7j	13,5 ^c	19,5 ^c	33 ^b	39,5 ^{ab}	45 ^a	p<0.01
	14j	12,5 ^d	17,5 ^c	32 ^b	44 ^a	44 ^a	p<0.01
	21j	12,5 ^e	17,5 ^d	30,5 ^b	40 ^b	49,5 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	9,5 ^e	14,5 ^d	24 ^c	34 ^b	38 ^a	p<0.01
	7j	13 ^b	19,5 ^{ab}	30 ^a	27 ^a	29,5 ^a	p<0.01
	14j	10 ^e	17,5 ^d	21,5 ^c	31 ^b	40 ^a	p<0.01
	21j	11 ^d	14 ^d	23 ^c	33,5 ^b	38,5 ^a	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	10,5 ^e	23,5 ^d	29,5 ^c	40 ^b	46,5 ^a	p<0.01
	7j	11 ^e	22,5 ^d	29,5 ^c	39 ^b	47 ^a	p<0.01
	14j	11 ^e	22,5 ^d	29,5 ^c	39 ^b	47 ^a	p<0.01
	21j	12,5 ^e	21 ^d	29 ^c	38 ^b	48,5 ^a	p<0.01

j : Jours; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls

1.3.7. Couleur

D'une façon générale, pendant les 21 jours de stockage à 4°C, les dégustateurs ont bien accepté la couleur des laits fermentés additionnés d'extrait à l'hexane aqueux de thym particulièrement à niveaux d'incorporation de 2 et 4% ; 16.75 et 20.62, somme des rangs, en moyenne, successivement.

En revanche, durant cette même période d'étude, la couleur des laits fermentés additionnés d'extrait hydroéthanolique de *T. vulgaris* a été sensiblement (p<0,01) détériorée avec

l'adjonction de 2 à 4 à 6 à 8% d'extrait de *T. vulgaris* ; avec des valeurs de somme des rangs qui ont varié de 12,33 à 20,33 à 33,33 à 40,13 et à 45,5 en moyenne, successivement.

La couleur des laits fermentés enrichis en extrait hydrométhanolique n'a pas grandement changée durant l'étude expérimentale et a montré des résultats proches ($p > 0.05$) au yaourt standard témoin sans extrait de thym ; 19,25 à 29,25 sommes des rangs, en moyenne.

Enfin le témoin a présenté une meilleure couleur que les autres essais enrichis d'extrait aqueux de thym à 2, 4, 6 et 8% ; avec des valeurs de la somme des rangs de 12,4 contre 21,6, 31,75, 39,6, 43,7, en moyenne, respectivement (**Tableau 24**).

Tableau 24. Variation sensorielle de la couleur (somme des rangs) des laits fermentés additionnés de différents types d'extraits phénoliques de *T. vulgaris*.

Périodes	Temps	Taux d'incorporations des extraits de thym dans le yaourt					Effets des taux d'extraits incorporés
		0%	2%	4%	6%	8%	
Extrait hexane aqueux							
Post-acidification	1j	35,5 ^b	14 ^c	16 ^c	38,5 ^b	45 ^a	p<0.01
	7j	32 ^a	20 ^b	17 ^b	36 ^a	43 ^a	p<0.01
	14j	26 ^b	13,5 ^c	23,5 ^b	40 ^a	47 ^a	p<0.01
	21j	15 ^c	19,5 ^c	26 ^b	43 ^a	46,5 ^a	p<0.01
Extrait hydroéthanolique							
Post-acidification	1j	11 ^d	20,5 ^c	36 ^b	39 ^b	44 ^a	p<0.01
	7j	14 ^c	23 ^b	37 ^a	37,5 ^a	45 ^a	p<0.01
	14j	11,5 ^e	18,5 ^d	31 ^c	42 ^b	47 ^a	p<0.01
	21j	12 ^d	18,5 ^c	30,5 ^b	42 ^a	46 ^a	p<0.01
Extrait hydrométhanolique							
Post-acidification	1j	21 ^b	19,5 ^b	26,5 ^{ab}	24,5 ^{ab}	33,5 ^a	p<0.01
	7j	17 ^b	24 ^a	26 ^a	27 ^a	26 ^a	p<0.01
	14j	19,5 ^b	22,5 ^b	22 ^b	17,5 ^b	38,5 ^a	p<0.01
	21j	19,5 ^b	26 ^a	24,5 ^{ab}	28 ^a	19 ^b	p<0.01
Extrait aqueux							
Post-acidification	1j	13,5 ^d	18,5 ^c	29,5 ^b	42,5 ^a	46 ^a	p<0.01
	7j	12 ^d	22,5 ^c	32 ^b	40,5 ^a	45 ^a	p<0.01
	14j	11,5 ^c	24 ^b	36 ^a	34,5 ^a	38,5 ^a	p<0.01
	21j	12,5 ^d	21,5 ^c	29,5 ^b	41 ^a	45,5 ^a	p<0.01

j : Jours; p>0.05 : Effet non significatif du facteur étudié, p<0.05 : Effet significatif du facteur étudié ; p<0.01 : Effet hautement significatif du facteur étudié ; a, b, c, d, e...etc : comparaison des moyennes deux à deux par le test de Newman – Keuls

2. Discussion

2.1. Qualité physicochimique des yaourts

Les espèces de bactéries lactiques productrices de lactate les plus couramment utilisées comme cultures starters dans la production industrielle de yaourt sont *St.thermophilus* et *Lb.bulgaricus* (**Ginovart et al., 2002**). Lorsqu'elles coexistent dans la matrice du lait, ces deux souches modifient de manière synergique les propriétés physicochimiques et sensorielles du yaourt, comparativement aux autres laits fermentés produits à partir d'une seule souche (**Georgala et al., 1995**). Les deux espèces sont capables de produire de l'acide lactique et une variété de composés aromatiques, d'acides organiques et d'exo- polysaccharides, qui confèrent une saveur et une texture typiques au yaourt (**Cheng, 2010**). D'une manière générale, l'ajout d'extraits hydroalcooliques de *T. vulgaris* jusqu'à un seuil de 4% n'a pas affecté le nombre de germes spécifiques, ni la qualité rhéologique et organoleptique du yaourt étuvé.

Durant la conservation au froid à 4°C, les valeurs de pH ont tendance à diminuer d'une manière plus importante dans le yaourt standard que ceux additionnés d'extrait de thym. Ces réductions de pH résultent sans aucun doute d'une production d'acide lactique par fermentation du lactose du lait par les deux souches spécifiques du yaourt à savoir *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* contenues dans le milieu et qui continuent à croître relativement même durant l'entreposage des produits expérimentaux à 4°C (**Luquet, 1990**). Le lactate est un composant essentiel dans le procédé de fabrication de yaourt car il favorise la formation du gel du produit en réduisant le pH du milieu jusqu'au pHi (4.6) de coagulation lactique des caséines du lait tout en induisant une solubilité partielle du phosphate de calcium micellaire (**Zhang et al., 2011**). En fin de production, sa teneur dans le yaourt est généralement d'environ 0,9 %, et elle est surtout à l'origine du goût piquant et acide du produit fini (**Cheng, 2010**). Affectée par l'effet antimicrobien des composés phénoliques de thym (**Zairi et al., 2018**) l'activité fermentaire des deux espèces de bactéries lactiques a été nettement réduite dans les yaourts additionnés d'extraits de la plante notamment à de fortes doses de 6 et 8% avec comme conséquence une moindre production de lactate dans le milieu dont la consistance rhéologique a été relativement détériorée.

Il a été bien établi que les extraits expérimentaux sont riches en alcaloïdes, flavonoïdes, tanins, triterpènes et saponines. A ce propos plusieurs auteurs (**Kivilompolo et Hyotylainen,**

2007 ; Stahl-Biskup et Venskutonis ; 2012 Roby et al., 2013) ont rapporté aussi que le *T. vulgaris* est une source intéressante en composés phénoliques dont l'apigénine, la fisétine, la rutine, l'acide gallique, l'acide rosmarinique, le thymol et le carvacrol exerçant des effets antimicrobiens à l'égard de nombreux microorganismes pathogènes et non pathogènes tels, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, et *Lactobacilles* (Nieto, 2020).

Pendant les quatre heures de fermentation la croissance de *St. thermophilus* est meilleure que celle de *Lb. bulgaricus* particulièrement dans les yaourts à faibles doses d'extraits de thym de 0, 2 et 4%. En revanche, au cours de la conservation le germe *St. thermophilus* a continué à croître dans les produits additionnés d'extraits de thym d'une manière plus avantageuse que celle de *Lb. bulgaricus*. A ce propos, il est bien connu que le démarrage de la fermentation du lait au cours du procédé de fabrication du yaourt est assuré par le germe *St. thermophilus* qui utilise comme facteurs de croissance les acides aminés libres dans le milieu ou libérés par les *Lb. bulgaricus*. L'acide lactique produit abaisse le pH du milieu jusqu'à environ 5,25, où la croissance de *St. thermophilus* est ralentie, la fermentation est ensuite achevée par le germe *Lb. bulgaricus* plus acidotolérant qui utilise comme facteurs de croissance le CO₂ et l'acide formique précédemment produite par *St. thermophilus* (Yamauchi et al., 2018). Apparemment, l'extrait de thym ajouté comme additif dans le yaourt semble compromettre partiellement la prolifération du germe *Lb. bulgaricus* dont la croissance et la capacité à fermenter le lactose ont été modérément réduites pendant la phase de post-acidification.

D'après les résultats de notre étude, les valeurs du pH des yaourts expérimentaux ont varié d'une manière inversement proportionnelle en fonction de la concentration variable de 0 à 8% et du type d'extraits phénoliques obtenu selon l'accroissement de la polarité du solvant d'extraction utilisé ; à l'hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux. Les valeurs les plus basses ($p < 0.01$) du pH (4,35 et 4,31) ont été enregistrées aux 21^{èmes} jours de stockage des yaourts enrichis à 2 et 4% d'extrait hydroéthanolique ; tant dis que, les valeurs les plus élevées ($p < 0.01$) de 5,43 et 5,57 ont été notées dans les laits fermentés additionnés d'extrait hydrométhanolique à des taux sévères de 6% et 8%, respectivement. Malgré ces importantes variations de pH constatées dans les laits fermentés expérimentaux fortifiés aux extraits de thym, les résultats restent en majorité conformes à la norme standard requise pour un yaourt étuvé (FDA, 2009).A

ce propos, d'après **Hwang et Lee (2006)**, le pH optimal d'un lait fermenté type ferme mis sur le marché doit avoisiner environ 3,27 à 4,59. Dans cette étude, après avoir stocké les yaourts expérimentaux pendant 21 jours à 4°C, le pH s'inscrit également dans cette fourchette optimale. Cela suppose que la qualité du yaourt additionné d'extraits phénoliques du thym a été préservée au plan de l'acidité durant la conservation au même titre que le yaourt type ferme habituellement mis sur le marché. De même, **Amirdivani et Baba (2011)** ont rapporté que la fermentation avec des herbes augmentait l'activité métabolique des bactéries du yaourt et que le pH était diminué en raison de la production accrue d'acides organiques par les bactéries de l'acide lactique.

L'ajout d'extraits de *T. vulgaris* comme additifs ne semble pas affecter remarquablement l'aptitude des deux bactéries spécifiques du yaourt à fermenter le lactose. En effet, durant la période expérimentale, l'acidité produite dans tous les échantillons expérimentaux se situe bien dans la fourchette normale rapportée par **(Davis, 1970)** et variable de 72 à 120°D. Cette acidité Dornic est un facteur important et très recherché, car elle affecte non seulement la durée de conservation, mais aussi l'acceptabilité du produit par les consommateurs **(Al-Otaibi et El Demerdash, 2008)**.

Par ailleurs, durant la période expérimentale, il a été constaté une évolution inverse ($p < 0.01$) de l'acidité en fonction des taux d'incorporation d'extraits du thym ; avec des teneurs qui ont varié de 94 à 72°D dans les essais préparés à 0 et 8% d'extrait de la plante étudiée. Ceci suppose que les principaux composés antimicrobiens contenus dans les extraits de thym dont principalement les composés phénoliques et les flavonoïdes ont réduits particulièrement aux doses élevées d'extraits incorporées l'activité fermentaire des souches spécifiques du yaourt ; ce qui s'est traduit par une baisse partielle de la production de lactate dans le milieu **(El Ajjouri et al, 2010)**.

Les études portées à ce jour sur l'influence des composés phénoliques sur la croissance et la viabilité des espèces de bactéries lactiques spécifiques du yaourt sont très limitées. Sur la base des résultats trouvés, il apparaît nettement que les valeurs d'acidité des laits fermentés enrichis en extraits phénoliques de *T. vulgaris* ont augmenté d'une manière normale pendant la période de stockage ; quoique les teneurs les plus élevées ont été déterminées avec le yaourt du groupe témoin. L'effet antimicrobien des principaux composés phénoliques de *T. vulgaris* (l'acide gallique, l'acide rosmarinique, le thymol, le carvacrol...etc.) **(El-Ahwal et al 2019)** sur la

viabilité des cultures starter du yaourt et de leurs aptitudes à produire du lactate dans le milieu semble s'estimer en fonction du temps de stockage au froid pendant la phase de post acidification. Ces résultats sont en accord avec ceux d'**Abbas et Osman (1998)** qui ont rapporté que l'acidité totale des yaourts fortifiés d'extrait de thym a tendance à augmenter progressivement pendant la période de stockage. Néanmoins, jusqu'à la fin de la période de conservation au froid à 4°C, après 21 jours, l'acidité des produits expérimentaux est restée conforme à la normale de moins de 150°D pour un yaourt ferme destiné à la consommation humaine (**Joint FAO/WHO, 2003**).

Concernant la viscosité apparente des produits expérimentaux, elle a considérablement augmenté dans tous les échantillons de 55,86 à 82,4 Kg/ms en moyenne à 0 heure de fermentation à des valeurs variables entre 221,19 et 375,4 Kg/ms, en moyenne au 21^{ème} jour de la période de post acidification. **Xu et al. (2015)** ont rapporté que lorsque des échantillons de yaourt sont fermentés par différentes souches acidifiantes, une viscosité plus élevée est souvent observée dans les échantillons de yaourt enrichis en composés phénoliques et en antioxydants par rapport au yaourt témoin. Au contraire, une relation inversement proportionnelle a été établie dans le cas de notre étude entre la viscosité et les concentrations (0, 2, 4, 6 et 8%) d'extraits phénoliques du thym ajoutées dans les yaourts quel que soit leur nature (à l'hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux). Il est bien connu qu'au cours du processus de fermentation, les cultures bactériennes produisent de l'acide lactique à partir du lactose (principal glucide du lait), ce qui diminue le pH du milieu et provoque au point isoélectrique des caséines (pHi= 4,6) la coagulation lactique des protéines constitutives pour leur donner une structure visqueuse en formant un gel lactique (**Nagaoka, 2019**). La texture et l'onctuosité sont des éléments importants pour que les consommateurs apprécient la qualité du yaourt. Selon (**Schmidt et al., 1994**), la viscosité peut aussi être conférée par les exopolysaccharides (EPS) composés de rhamnose, d'arabinose ainsi que de mannose produits notamment par les *St. thermophilus* au cours de leur croissance durant la phase de fermentation. D'après **Tamime et Robinsons (2007)**, *Lb. bulgaricus* présente également une aptitude à produire pendant la phase surtout de post acidification des EPS composés de galactose, de glucose et de rhamnose à raison de 4:1:1. Ces composés glucidiques sont capables de se lier aux caséines du lait et d'augmenter la viscosité, ainsi que la qualité rhéologique du yaourt (**Sahan et al., 2008**). Les faibles résultats de viscosité constatés dans les laits fermentés additionnés d'extraits de thym à 6 et 8% résultent probablement

de l'action des polyphénols du thym sur le réseau d'agrégation de caséines (**Tamime et Robinson, 2007**). A ce propos, certains auteurs ont bien confirmé que la consistance des laits fermentés diminue relativement avec l'ajout d'une forte concentration d'extraits de plantes riches en principaux composés bioactifs, qui réduisent la capacité des protéines laitières à se coaguler pour se solubiliser partiellement dans le milieu aqueux du lait (**Ramaswamy et Basak, 1992**).

Certains auteurs ont tenté de définir le phénomène d'interactions entre les protéines du lait et les polyphénols sans vraiment y parvenir en raison de la multitude des facteurs impliqués et de leur complexité. Seul un modèle d'interaction polyphénol-protéine proposé dans la littérature en 1996 correspondait parfaitement aux résultats obtenus. Dans le cas où le nombre de polyphénols est égal au nombre de sites de liaison des protéines, cela devrait produire le plus grand réseau, ce qui se traduirait par des particules plus grosses et une plus grande viscosité du gel formé. Avec un excès de protéines par rapport aux polyphénols, chaque molécule de polyphénol devrait être capable de lier deux molécules de protéines, mais il serait peu probable que toutes ces protéines puissent être liées à d'autres (**Seibert et al. 1996**). Par ailleurs, l'effet antimicrobien des principaux composés constitutifs des extraits de thym comme les alcaloïdes, les flavonoïdes, les tanins, les triterpènes et les saponines démontré à l'égard de nombreux germes pathogènes et bénéfiques (tels *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Lactobacilles* et les *Streptocoques*) (**Nieto, 2020**) est sans doute à l'origine d'une baisse de l'activité des germes spécifiques à produire les exopolysaccharides impliqués dans la viscosité et l'onctuosité des produits finis.

2.2. Cultures starters des yaourts

Le processus de fermentation dans les laits fermentés est étroitement lié à la croissance et à l'activité de la microflore lactique. Pendant la fermentation, une croissance rapide des bactéries lactiques a été observée dans tous les échantillons expérimentaux. Les numérations de *Lb. bulgaricus* et de *St. thermophilus* ont passées respectivement de $13,6 \times 10^4$ à 81×10^4 UFC /ml et de 24×10^4 à 181×10^4 UFC/ml. Aussi, pendant cette période, il a été constaté une nette augmentation du nombre de *St. thermophilus* par rapport à celui de *Lb. bulgaricus* et ceci quel que soit le type d'extrait de *T. vulgaris* (à l'hexane aqueux, hydroéthanolique, hydrométhanolique et aqueux) ajouté au yaourt. Par ailleurs, de la première jusqu'à la deuxième heure de fermentation, une croissance rapide de *St. thermophilus* a été établie comparativement au *Lb. bulgaricus*; alors qu'au-delà de la deuxième heure jusqu'à la fin de fermentation, le nombre de

Lb. bulgaricus a augmenté plus rapidement. Ainsi, il apparaît que la croissance des *St. thermophilus* est plus accélérée durant les premières heures de fermentation ; mais lorsque le pH descend en dessous de 5,5, la prolifération de ce germe est ralentie et les *Lb. bulgaricus* ont tendance à prédominer. Ces réponses sont sans doute en relation avec le phénomène symbiotique qui caractérise les deux souches spécifiques du yaourt dont le mécanisme ne semble pas être altéré.

En effet lors de la production de yaourt, l'utilisation combinée de *St. thermophilus* et *L. bulgaricus* permet de valoriser l'interaction indirecte positive existant entre ces deux espèces. Cette interaction mutuellement favorable aux deux espèces est appelée protocoopération. Elle se traduit par une augmentation de la vitesse d'acidification par rapport à celles observées en cultures pures, un accroissement des concentrations bactériennes, une protéolyse plus prononcée et une amélioration de la production des composés d'arômes (acétaldéhyde notamment) et de la stabilité physique du produit (réduction des problèmes de synérèse) (Davis, 1971). La bactérie *St. thermophilus*, qui présente naturellement une faible activité protéolytique, est stimulée par les petits peptides et acides aminés formés dans le lait grâce à l'activité protéolytique du lactobacille, permise par l'action de sa protéase de paroi. En retour, *St. thermophilus* fournit du CO₂ et de l'acide formique qui, tous deux, vont stimuler la croissance de *Lb. Bulgaricus* (Beal et Helincks, 2019).

Apparemment, en fin de fermentation, l'enrichissement du yaourt à 2 et 4% d'extraits phénoliques de thym n'a pas eu d'effet significatif ($p > 0.05$) sur la croissance des cultures starters *St. thermophilus* et *Lb. bulgaricus* contrairement aux doses sévères de 6 et 8% d'extraits de la plante étudiée ajoutés aux produits ayant dénombré un nombre de germes significativement ($p < 0.05$) plus réduit que le témoin. Malgré ces différences, dans l'ensemble, après 4 heures de fermentation, la population microbienne en ces deux germes dans tous les laits fermentés expérimentaux est en accord avec la norme 243-2003 du *Codex Alimentarius* (Joint FAO/WHO, 2003) fixant un nombre obligatoire dans le yaourt de 10⁷ UFC /g de produit fini (Martin et Adams, 2008).

D'après plusieurs auteurs, les extraits de thym ajoutés au yaourt sont une source non négligeable en composés phénoliques dont l'apigénine, la fisétine, la rutine, l'acide gallique, l'acide rosmarinique, le thymol et le carvacrol (Kivilompolo et Hyotylainen, 2007; Stahl-

Biskup et Venskutonis, 2012). Ces dernières années, le concept de prébiotiques attribué aux polyphénols s'est développé pour devenir plus complet. A ce propos, **Vodnar et Socaciu (2012)** ont indiqué que la micro-encapsulation de LAB avec un extrait de thé vert a pu augmenter la viabilité des cellules et a maintenu la stabilité bactérienne. En outre, il a été signalé que des extraits de polyphénols de vin rouge et les flavonols dérivés du cacao ont modulé le microbiote de l'intestin humain, ce qui indique que ces polyphénols naturels ont un potentiel prébiotique (**Queipo-Ortuño et al., 2012**). Concernant notre étude, globalement, les composés phénoliques trouvés dans les différents extraits de *T. vulgaris* lorsqu'ils ont été incorporés à de fortes doses ne semblent pas améliorer directement les paramètres de transformation du yaourt, tels que la cinétique de l'acidification, la viabilité des cultures starters et la viscosité des produits.

L'acide gallique, l'acide rosmarinique et l'acide cinnamique ont été les principaux composés phénoliques retrouvés dans les extraits de *T. vulgaris* expérimentaux. De plus, ces extraits semblent très riches en certains flavonoïdes tels que l'apigénine, la fisétine, la rutine et la quercétine. Ces résultats suggèrent que l'activité antimicrobienne des yaourts enrichis à 6 et 8% d'extrait riches en composés bioactifs inhibiteur de la croissance microbienne est plus élevée que ceux enrichis à 2 et 4% ; ceci peut expliquer sans doute la diminution du nombre des cellules viables de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* en fonction des doses élevées d'extraits de la plante incorporées. Néanmoins nos résultats concordent bien avec les conclusions de **Chouchouli et al., (2013)** qui ont indiqué que l'enrichissement des yaourts à des seuils de 5 à 10 mg équivalents acide gallique/100g n'affecte pas la numération des germes lactiques dont ceux du genre *Lb. bulgaricus*.

La viabilité de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* a été également relativement affectée par le type et la concentration d'extrait de *T. vulgaris* ajoutés au cours du stockage des produits au froid à 4°C. Durant cette période de post-acidification, le nombre de *St. thermophilus* et de *Lb. bulgaricus* dans les échantillons expérimentaux ont tendance à augmenter respectivement de 13 à 298 $\times 10^4$ UFC/ml et de 13,6 à 250 $\times 10^4$ UFC/ml jusqu'au 14^{ème} jour puis à diminuer légèrement à 108 $\times 10^4$ UFC/ml et à 181 $\times 10^4$ UFC/ml au 21^{ème} jour. D'après, **Robinson (2002)** après 4 semaines de stockage au froid, la croissance et le métabolisme de *St. thermophilus* moins acidotolérant sont généralement les plus inhibées probablement par la forte acidité du milieu produite par le *Lb. bulgaricus* plus acidotolérant. Par ailleurs, durant l'étude, il apparaît

comparativement au yaourt témoin, que le degré de prolifération de ces germes lactiques dans les laits fermentés enrichis à 2, 4, 6 et 8% d'extraits de thym a été moins important de 75 % pour *St.thermophilus* et de 89% pour *Lb. bulgaricus*, respectivement. Ces réponses sont assurément liées à l'effet antimicrobien des composés bioactifs exercés sur les germes spécifiques des yaourts additionnés d'extraits de thym

Par ailleurs, d'après **Michael et al. (2010)**, la présence de certains prébiotiques dans les extraits des plantes médicinales dont le thym pourrait sans doute expliquer la viabilité améliorée des levains lactiques constatée dans les yaourts expérimentaux au 7^{ème} et au 14^{ème} jour de stockage au froid. En effet, d'après (**Reverón et al., 2015**), les bactéries du genre *Lactobacillus* sont caractérisées par une grande capacité à tolérer les composés polyphénoliques. Il a été, même, prouvé que les phénols, tels que les acides hydroxycinnamiques (acide caféique, acide p-coumarique, acide férulique) présents dans la matrice alimentaire stimulent la croissance des Lactobacilles et qu'ils modifient remarquablement le cours des processus métaboliques tels que la fermentation lactique. **Filannino et al. (2014)**, ont rapporté aussi qu'à faibles concentrations, l'acide gallique peut stimuler de manière significative la croissance et l'activité métabolique des Lactobacilles (**Filannino et al., 2014**).

2.3. Qualité sensorielle des yaourts expérimentaux

Le yaourt témoin ainsi que les laits fermentés expérimentaux enrichis à 2 et 4% d'extraits phénoliques de thym obtenus soit à l'hexane aqueux ou dans une solution hydroéthanolique ou hydrométhanolique et/ou aqueux sans solvant organique ont reçu les meilleurs scores pour la majorité des caractéristiques sensorielles testées par les panélistes qui les ont d'ailleurs caractérisés par une saveur et un arôme agréable, une texture homogène de type crémeuse et une couleur blanchâtre.

Au fait au cours de la fabrication d'un yaourt, les composants du lait sont convertis par les deux souches bactériennes lactiques spécifiques *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus* en composés carbonylés, en acides non volatils et volatils tels que l'acide lactique, l'acétaldéhyde, l'acétone, l'acétoïne, le diacétyle et l'acétate conférant ainsi au produit fini sa saveur et son goût caractéristique (**Beshkova et al., 1997**). L'élaboration bactérienne de ces

substances dans le milieu ne semble pas être affectée même à un taux d'incorporation d'extrait de thym de 4% dans le yaourt dont la saveur et le goût ont été maintenues comparables au témoin.

En générale, les principales critères sensoriels de qualité du yaourt comme notamment la texture, le goût et l'arôme peuvent surtout varier en fonction de plusieurs autres facteurs qui s'avèrent être bien maîtrisés durant l'expérimentation dans les produits préparés jusqu'à un seuil de 4% d'extraits de thym tels les ferments lactiques et de leurs métabolites, les ingrédients ultérieurs ajoutés et les diverses conditions de fabrication (par exemple, standardisation, homogénéisation, traitement thermique, refroidissement, enrichissement...etc.) (Nagaoka, 2019). A ce propos, il est à rappeler qu'aucun arôme, ni saccharose, ni autres additifs quelconques n'ont été ajoutés aux essais de laits fermentés préparés sans et avec les extraits de *T. vulgaris* qui ont été préparés par ailleurs en respectant les mêmes conditions expérimentales.

Par ailleurs, dans une étude réalisée par Chouchouli et al. (2013), il a été démontré que l'enrichissement du yaourt avec l'extrait phénolique de pépins de raisin n'a pas affecté la teinte blanchâtre caractéristique des yaourts, et les changements de couleur même à des forts taux d'incorporation n'ont pas été détectés visuellement chez l'ensemble des panelistes impliqués dans l'étude.

En revanche, les yaourts préparés à des pourcentages élevés en extraits de thym en l'occurrence à raison de 6 et 8% ont présenté de médiocres caractéristiques de saveur et d'arôme ainsi qu'un goût amer plus prononcé et une faible consistance que le témoin standard. Ces constatations corroborent ceux d'Al-Otaibi et El Demerdash (2008) qui ont bien confirmé que la qualité sensorielle est sensiblement altérée avec l'augmentation de la concentration d'extrait de thym riche en composés phénoliques ajoutée au yaourt.

Il est bien établi que le *T. vulgaris* est riche en composés phénoliques constitués principalement de l'acide rosmarinique, de l'acide caféique, de l'acide gentisique, de l'acide p-coumarique, de l'acide férulique...etc. (Kivilompolo et Hyotylainen, 2007 ; Stahl-Biskup et Venskutonis, 2012). De nombreux auteurs ont avancé que ces composés phénoliques exercent des effets antimicrobiens avérés contre de nombreux microorganismes tels *Salmonella*, *Staphylococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, et *Lactobacillus*. Etc. (Tohidpour et al., 2010 ; Sienkiewicz et al., 2011 ; Nabavi et al., 2015 ; Nieto, 2020).

L'acide gallique, l'acide rosmarinique et l'acide cinnamique, l'apigénine, la fisétine, la rutine et la quercétine comptent parmi les principaux composés phénoliques retrouvés dans les extraits de la plante autochtone objet de l'étude (*T. vulgaris*) qui ont d'ailleurs démontré un effet antimicrobien de type bactéricide contre *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*. Apparemment, les composés phénoliques contenus dans les extraits de la plante étudiée et ajoutés à des doses sévères de 6 et 8% dans les laits fermentés ont freiné relativement la croissance des deux souches spécifiques lactiques du yaourt (*Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bulgaricus*) avec comme conséquence une baisse de leurs pouvoir à produire dans le milieu du lactate, des composés aromatiques ainsi que des exopolysaccharides à l'origine d'une relative altération de goût, de la flaveur et des critères rhéologiques (adhésivité et cohésivité) des produits par rapport au témoin.

Par ailleurs, l'apport des composés phénoliques à des taux d'incorporation d'extraits de thym de 2 et 4% a amélioré nettement la fraîcheur et l'odorat du yaourt ; alors qu'à des taux d'incorporations plus élevés ces critères organoleptiques ont été moins bien appréciés par les panelistes. Ainsi, il apparaît que l'ajout des principaux composés bioactifs contenus dans les extraits de thym dont l'acide gallique, l'acide rosmarinique l'apigénine et la fisétine (**Reddy et al., 2014**) semblent donc améliorer les critères sensoriels du yaourt jusqu'à un certain seuil optimum de (1.64 µg EAG/ml de produit) ; alors qu'au-delà de cette concentration le produit semble perdre drastiquement de sa qualité.

Conclusion partielle

L'ajout d'extraits de *T. vulgaris* à 2 et 4% a permis de préserver les valeurs normales de pH, d'acidité Dornic et de viscosité apparente des laits fermentés au même titre que le témoin.

Aussi, le nombre de bactéries lactiques dénombré dans ces produits a atteint la valeur minimale requise pour les produits laitiers fermentés de 10^7 UFC /g de produit fini.

Par ailleurs, certains critères organoleptiques tels que l'acidité et la cohésivité des laits fermentés additionnés d'extraits phénoliques de thym à 2 et 4% ont été nettement améliorés sinon qualifiés par les panelistes de comparables au yaourt préparé à 0% d'extraits de thym.

Il est donc possible d'ajouter les extraits de thym riches en composés phénoliques jusqu'à un taux de 4% et de fabriquer un lait fermenté alicament dont les qualités physicochimiques, rhéologiques, microbiologiques et organoleptiques sont similaires au yaourt standard.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les consommateurs sont très conscients de la nécessité de s'alimenter d'une manière saine et équilibrée. Ils s'orientent souvent à l'utilisation d'aliments auxquels sont ajoutés des ingrédients naturels plutôt que des composés chimiques synthétiques à effets néfastes pour la santé. Des preuves irréfutables de plus en plus nombreuses confirmant les intérêts des polyphénols naturels des plantes médicinales sur la santé humaine ont suscité notre curiosité à les incorporer comme additifs dans certains produits alimentaires transformés.

L'incorporation dans le yaourt d'extraits phénoliques d'origine végétale telle ceux contenus dans le *T. vulgaris* est une approche pratique pour augmenter le contenu phénolique du produit et améliorer son profil antioxydant. L'enrichissement du yaourt d'antioxydants naturels s'inscrit pleinement dans la demande sans cesse croissante des consommateurs pour les aliments "fonctionnels".

Des taux en composés phénolique totaux (CPT) allant de 86,83 à 243,74 EAG/ml et en flavonoïdes allant de 05,12 à 42,21µg EQ/ml d'extrait ont été enregistrés dans les différents extraits de thym étudiés.

Cette espèce de *lamiacées* est bien connue pour contenir une série de métabolites secondaires, tels que les terpénoïdes et les flavonoïdes. L'analyse quantitative et qualitative par chromatographie liquide de haute performance a révélé la présence d'une multitude de composés phénoliques dans les différents extraits de la plante étudiée dont l'apigénine, la fisétine, la rutine, l'acide gallique, l'acide rosmarinique le thymol et le carvacrol. L'apigénine a constitué 40% des composés phénoliques totaux (CPT) dans l'extrait hydrométhanolique. L'acide gallique a été retrouvé à 52 % et 24% des CPT dans les extraits aqueux et hydroéthanolique, respectivement. L'extrait à l'hexane aqueux semble riche en thymol ; 54% des CPT. Les solvants à fortes polarités ont été plus efficaces à extraire davantage de composés phénoliques que ceux à faible polarité. Le méthanol et l'éthanol ont représenté les meilleurs solvants d'extraction des principaux composés phénoliques de *T. vulgaris*.

Seul un nombre limité d'études ont été réalisées pour analyser l'influence des composés phénoliques sur la croissance et la viabilité des cultures starter de yaourt. Diverses méthodes et tests ont été adoptées dans cette étude afin de pouvoir mettre en lumière cette influence tels que

Conclusion générale

le taux de croissance, le diamètre d'inhibition, la concentration minimale inhibitrice et bactéricide. Apparemment, à des concentrations supérieures à 60% d'extraits phénoliques de *T. vulgaris* le taux de survie de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* peut être réduit de moitié (effet potentiellement inhibiteur). En revanche, ces mêmes bactéries ont survécu à des doses d'extraits phénoliques inférieures à 40% ; avec un taux de croissance supérieure à 64%.

La supplémentation du yaourt en polyphénols naturels de thym s'avère une excellente alternative pour tirer profit des interactions bénéfiques entre ces composés bioactifs et les cultures starter *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus*. Les données recueillies ont montré que l'ajout de 2 à 4 % d'extraits phénoliques de thym au yaourt n'affecte pas les valeurs normales du pH, de l'acidité dornique et de la viscosité apparente ainsi que les propriétés sensorielles du produit pendant sa période de conservation. Aussi, le nombre de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts fortifiés aux extraits de thym était conforme aux normes requises.

Cette étude a bien montré que les extraits phénoliques de thym peuvent être ajoutés dans le yaourt pour augmenter son contenu phénolique total son activité antioxydante, ouvrant de nouvelles perspectives pour l'exploitation de ces extraits par le secteur laitier.

Le lien entre les résultats in vitro et les conséquences in vivo chez l'humain reste un défi à surmonter avant l'application à large échelle des polyphénols des plantes médicinales comme ingrédients ou additifs naturels en industrie agroalimentaires. D'autres études de recherche développement complémentaires sont nécessaires et doivent être orientés pour :

- Examiner l'activité antioxydante au cours de la conservation du yaourt additionné d'extraits phénoliques naturels des plantes médicinales dont ceux du thym.
- Valider les effets promoteurs de la santé de ces yaourts par des études in vivo portant sur la biodisponibilité des polyphenols dans le système circulatoire.
- Optimiser les combinaisons possibles entre les principaux composés phénoliques des plantes médicinales et les bactéries probiotiques du yaourt afin de formuler de nouveaux laits fermentés ayant des propriétés nutraceutiques spécifiques.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

- Abbas FM, Osman MM. (1998).** Properties of labneh like products manufactured using acid and acid-rennet coagulation. *Ann. Agric.Sci. – Moshtohor.*, 36(1): 401-411.
- Adisakwattana S. (2017).** Cinnamic Acid and Its Derivatives: Mechanisms for Prevention and Management of Diabetes and Its Complications. *Nutrients*, 9(2), 163. <https://doi.org/10.3390/nu9020163>.
- Aguilar, O., & Hernández-Brenes, C. (2015).** Use of Modified Phenolic Thyme Extracts (*Thymus vulgaris*) with Reduced Polyphenol Oxidase Substrates as Anthocyanin Color and Stability Enhancing Agents. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 20(12), 22422–22434. <https://doi.org/10.3390/molecules201219854>.
- Akhlaghi, M., & Bandy, B. (2009).** Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 46(3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2008.12.003>.
- Alarcón, R., Flores, R. C., Ocampos, S., Lucatti, A., Galleguillo, L. F., Tonn, C., & Sosa, V. (2008).** Flavonoids from *Pterocaulon alopecuroides* with antibacterial activity. *Planta medica*, 74(12), 1463–1467. <https://doi.org/10.1055/s-2008-1081331>.
- Ali, F., Rahul, Naz, F., Jyoti, S., & Siddique, Y. H. (2017).** Health functionality of apigenin: A review. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1197-1238. doi:10.1080/10942912.2016.1207188.
- Alilou, H., Hassani, LMI., Barka, N., Bencharki, B., (2014).** Screening phytochimique et identification spectroscopique des flavonoïdes d'*Asteriscus graveolens* subsp. *odorus.*, *Afrique Science* 10(3) 316 – 328.
- Al-Otaibi, M. M., & El. Demerdash, H. J. A. J. (2008).** Improvement of the quality and shelf life of concentrated yoghurt (labneh) by the addition of some essential oils. 2, 156-161.
- Alu'datt, M. H., Rababah, T., Johargy, A., Gammoh, S., Ereifej, K., Alhamad, M. N., . . . Rawshdeh, M. (2016).** Extraction, optimisation and characterisation of phenolics from *Thymus vulgaris* L.: phenolic content and profiles in relation to antioxidant, antidiabetic and antihypertensive properties. *International Journal of Food Science & Technology*, 51(3), 720-730. doi:10.1111/ijfs.12944.
- Amirdivani, S., & Baba, A. S. (2011).** Changes in yogurt fermentation characteristics, and antioxidant potential and in vitro inhibition of angiotensin-1 converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *LWT - Food Science and Technology*, 44(6), 1458-1464. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.01.019.
- Amirdivani, S., & Baba, A. S. (2015).** Green tea yogurt: major phenolic compounds and microbial growth. *Journal of food science and technology*, 52(7), 4652–4660. <https://doi.org/10.1007/s13197-014-1670-6>.
- Anderson, J. W., & Gilliland, S. E. (1999).** Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(1), 43–50. <https://doi.org/10.1080/07315724.1999.10718826>.

Références bibliographiques

Anonyme 1, (2020). Classification for Kingdom Plantae Down to Species *Thymus vulgaris* L. United States Department of Agriculture.

<https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=THVU>. Date d'accès : 21/08/2020.

Anonyme 2, 2022. *Thymus vulgaris*, <https://sites.google.com/site/thymvarenave/description-botanique> date d'accès : 15/01/2022.

Anyasor, GN., Ogunwenmo, KO., Oyelana, OA., Akpofunure, BE. (2010). Phytochemical constituents and antioxidant activities of aqueous and methanol stem extracts of *Costusafer Ker Gawl* (Costaceae). *Afr J Biotechnol*; 9(31): 4880-4884.

Arts, I. C., & Hollman, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 317S–325S.

Arts, I., Sesink, A., Faassen-Peters, M., & Hollman, P. (2004). The type of sugar moiety is a major determinant of the small intestinal uptake and subsequent biliary excretion of dietary quercetin glycosides. *British Journal of Nutrition*, 91(6), 841-847. doi:10.1079/BJN20041123.

Aryana, K. J., & Olson, D. W. (2017). A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *Journal of Dairy Science*, 100(12), 9987–10013. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12981>.

Assiri, A. M., Elbanna, K., Abulreesh, H. H., & Ramadan, M. F. (2016). Bioactive Compounds of Cold-pressed Thyme (*Thymus vulgaris*) Oil with Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Journal of oleo science*, 65(8), 629–640. <https://doi.org/10.5650/jos.ess16042>.

Astani, A., Reichling, J., & Schnitzler, P. (2012). Melissa officinalis extract inhibits attachment of herpes simplex virus in vitro. *Chemotherapy*, 58(1), 70–77. <https://doi.org/10.1159/000335590>.

Awad, M. A., de Jager, A., & van Westing, L. M. (2000). Flavonoid and chlorogenic acid levels in apple fruit : characterisation of variation. *Scientia Horticulturae*, 83(3-4), 249-263. doi :10.1016/s0304-4238(99)00124-7.

Ayoola, GA., Coker, HAB., Adesegun, SA., Adepoju-Bello, AA., Obaweya, K., Ezennia, EC., (2008). Phytochemical screening and antioxidant activities of some selected medicinal plants used for malaria therapy in Southwestern Nigeria. *Trop J Pharm Res*; 7: 1019-1024.

Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F., . . . Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117(4), 426-436.

Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology*, 21(1), 33-42. doi:[https://doi.org/10.1016/S0740-0020\(03\)00046-7](https://doi.org/10.1016/S0740-0020(03)00046-7).

Baker, D.B. (1983). United States Patent Application, US 4 410 549.

Références bibliographiques

Ballester-Costa, C., Sendra, E., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J. A., &Viuda-Martos, M. (2013). Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Industrial Crops and Products*, *50*, 304-311. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.07.052>.

Barile, E., Bonanomi, G., Antignani, V., Zolfaghari, B., Sajjadi, S. E., Scala, F., &Lanzotti, V. (2007). Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. *Phytochemistry*, *68*(5), 596–603. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.10.009>.

Beal, C et Helincks, S. (2019). Fabrication des yaourts et des laits fermentés. Retrieved 18/02/2021, from Technique de l'ingénieur <https://www.techniques-ingenieur.fr/base-documentaire/procedes-chimie-bio-agro-th2/filiere-de-production-produits-d-origine-animale-42432210/fabrication-des-yaourts-et-des-laits-fermentes-f6315/>.

Beena, Kumar, D., & Rawat, D. S. (2013). Synthesis and antioxidant activity of thymol and carvacrol based Schiff bases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, *23*(3), 641-645. doi:<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.12.001>.

Bernatoniene, J., Cizauskaite, U., Ivanauskas, L., Jakstas, V., Kalveniene, Z., &Kopustinskiene, D. M. (2016). Novel approaches to optimize extraction processes of ursolic, oleanolic and rosmarinic acids from *Rosmarinus officinalis* leaves. *Industrial Crops and Products*, *84*, 72-79. doi :<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.01.031>.

Beshkova, D., Simova, E., Frengova, G., &Simov, Z. (1998). Production of flavour compounds by yogurt starter cultures. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *20*(3), 180-186. doi:10.1038/sj.jim.2900504.

Bintsis, T. (2018). Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. *AIMS Microbiol*, *4*(4), 665-684. doi:10.3934/microbiol.2018.4.665.

Bolivar, P., Cruz-Paredes, C., Hernández, L. R., Juárez, Z. N., Sánchez-Arreola, E., Av-Gay, Y., & Bach, H. (2011). Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of ethnopharmacology*, *137*(1), 141–147. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.04.069>.

Bonnardel, JP. (2013). L'argent colloïdal Alternative naturelle aux antibiotiques. Dangle, Toulouse, France.

Borugă, O., Jianu, C., Mișcă, C., Goleț, I., Gruia, A. T., &Horhat, F. G. (2014). *Thymus vulgaris* essential oil: chemical composition and antimicrobial activity. *Journal of medicine and life*, *7 Spec No. 3*(SpecIss 3), 56-60.

Bourgeois, C. M. and J.Y. Leveau, (1980). Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaires, Volume 3 : Le contrôle microbiologique. Lavoisier : Tech. Et Doc., pp : 331.

Boussetta, N., Soichi, E., Lanoisellé, J. L., &Vorobiev, E. (2014). Valorization of oilseed residues: Extraction of polyphenols from flaxseedhulls by pulse delectric fields. *Industrial Crops and Products*, *52*, 347-353. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.048>.

Bravo L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition reviews*, *56*(11), 317–333. <https://doi.org/10.1111/j.17534887.1998.tb01670.x>.

Références bibliographiques

- Brglez Mojzer, E., KnezHrncic, M., Skerget, M., Knez, Z., & Bren, U. (2016).** Polyphenols: Extraction Methods, Antioxidative Action, Bioavailability and Anticarcinogenic Effects. *Molecules*, 21(7). doi:10.3390/molecules21070901.
- Bruneton, J. (1999).** Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes médicinales, Editions Tec & Doc, Lavoisier, Paris, 1120p.
- Bylund, G. (1995).** Cultured milk products, in, Dairy Processing Handbook, Tetra Pak Processing Systems, Sweden. pp. 241-261.
- Camuesco, D., Comalada, M., Rodríguez-Cabezas, M. E., Nieto, A., Lorente, M. D., Concha, A., Zarzuelo, A., & Gálvez, J. (2004).** The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. *British journal of pharmacology*, 143(7), 908–918. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705941>.
- Cappelli P, Vannucchi V.(1990).**Chimic adegli alimenti. Zanichelli, Bologna, pp 143–147
- Cardona, F., Andrés-Lacueva, C., Tulipani, S., Tinahones, F. J., & Queipo-Ortuño, M. I. (2013).** Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8), 1415-1422. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.05.001>.
- Celebioglu, H. U., Delsoglio, M., Brix, S., Pessione, E., & Svensson, B. (2018).** Plant Polyphenols Stimulate Adhesion to Intestinal Mucosa and Induce Proteome Changes in the Probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Mol Nutr Food Res*, 62(4). doi:10.1002/mnfr.201700638.
- Chandan RC, Kilara A.(2013).**Manufacturing yogurt and fermented milks, 2nd edn. Wiley, Chichester, pp 297–317
- Chandan, R.C., 2014.**Dairy:fermentedproducts. In: Clark, S., Jung, S., Lamsal, B.P. (Eds.), Food Processing: Principlesand Applications, second ed. John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, West Sussex, UK, pp. 405–436 (Chapter 18).
- Chaovanalikit, A., & Wrolstad, R. E. (2004).**Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69(1), FCT67-FCT72. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x.
- Cheng, H. (2010).** Volatile flavor compounds in yogurt: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50, 938–950.
- Chouchouli, V., Kalogeropoulos, N., Konteles, S. J., Karvela, E., Makris, D. P., & Karathanos, V. T. (2013).** Fortification of yoghurts with grape (*Vitis vinifera*) seed extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 522-529.
- Cifelli, C.J., Houchins, J.A., Demmer, E., Fulgoni, V.L.(2017).**The dairy food group contributes essential nutrients to the diets of children and adults. *FASEB J*. 31 (1 Suppl), 648.14.
- Colman, G. (1990).***Streptococcus* and *Lactobacillus*. In *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity*, Vol. 2, 8th edn. (eds Parker, M.T. and Collier,L.H.). Edward Arnold, London, UK, pp. 119-159.

Références bibliographiques

Comalada, M., Camuesco, D., Sierra, S., Ballester, I., Xaus, J., Gálvez, J., & Zarzuelo, A. (2005). In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF-kappa B pathway. *European journal of immunology*, 35(2), 584–592. <https://doi.org/10.1002/eji.200425778>.

Corbin, C., Fidel, T., Leclerc, E. A., Barakzoy, E., Sagot, N., Falguières, A., . . . Hano, C. (2015). Development and validation of an efficient ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from flax (*Linum usitatissimum* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 26, 176–185. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ulsonch.2015.02.008>.

Corbo, M.R., Bevilacqua, A., Petruzzi, L., Casanova, F.P., Sinigaglia, M., 2014. Functional beverages: the emerging side of functional foods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13 (6), 1192–1206.

Corradini C.(1995). Chimica e tecnologia del latte. Tecniche Nuove, Milan, pp 235–236
Dalla Rosa M, Giroux F (2001) Osmotic treatments (OT) and problems related to the solution management. *J Food Eng* 49(2):223–236. doi:10.1016/S0260-8774(00)00216-8.

Corrales, M., Toepfl, S., Butz, P., Knorr, D., & Tauscher, B. (2008). Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulse electric fields: A comparison. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9(1), 85–91. doi :<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2007.06.002>.

Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Bell, H. C., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (teatreeoil). *Journal of applied microbiology*, 88(1), 170–175. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00943.x>.

Crespy, V., Morand, C., Besson, C., Manach, C., Demigne, C., & Remesy, C. (2001). Comparison of the intestinal absorption of quercetin, phloretin and their glucosides in rats. *J Nutr*, 131(8), 2109–2114. doi:10.1093/jn/131.8.2109.

Cutrim, C. S., & Cortez, M. A. S. (2018). A review on polyphenols: Classification, beneficial effects and their application in dairy products. *International Journal of Dairy Technology*, 71(3), 564–578. doi:10.1111/1471-0307.12515.

Da Porto, C., Porretto, E., & Decorti, D. (2013). Comparison of ultrasound-assisted extraction with conventional extraction methods of oil and polyphenols from grape (*Vitis vinifera* L.) seeds. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20(4), 1076–1080.

Dabija, A., Codină, G. G., Ropciuc, S., Gâtlan, A.-M., & Rusu, L. (2018). Assessment of the Antioxidant Activity and Quality Attributes of Yogurt Enhanced with Wild Herbs Extracts. *Journal of Food Quality*, 2018, 5329386. doi:10.1155/2018/5329386.

Dapkevicius, A., van Beek, T. A., Lelyveld, G. P., van Veldhuizen, A., de Groot, A., Linssen, J. P., & Venskutonis, R. (2002). Isolation and structure elucidation of radical scavengers from *Thymus vulgaris* leaves. *J Nat Prod*, 65(6), 892–896.

D'Archivio, M., Filesi, C., Di Benedetto, R., Gargiulo, R., Giovannini, C., & Masella, R. (2007). Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Annali dell' Istituto superiore di sanita*, 43(4), 348–361.

Références bibliographiques

Dave, R. I., & Shah, N. P. (1997). Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, 7(6), 435-443.

Davis, J.G. (1970). Laboratory control of yogurt. *Dairy Ind*; 36:139.

Davis, J.G. (1971), Enumeration and viability of *L.bulgaricus* and *St. thermophilus* in yogurts, *Dairy Industry*. **36**, 569-573

Day, A. J., Gee, J. M., DuPont, M. S., Johnson, I. T., & Williamson, G. (2003). Absorption of quercetin-3-glucoside and quercetin-4'-glucoside in the rat small intestine: the role of lactase phlorizin hydrolase and the sodium-dependent glucose transporter. *Biochemical pharmacology*, 65(7), 1199–1206. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(03\)00039-x](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(03)00039-x).

Del Rio, B., Linares, D. M., Ladero, V., Redruello, B., Fernández, M., Martín, M. C., & Alvarez, M. A. (2014). Putrescine production via the agmatine deiminase pathway increases the growth of *Lactococcus lactis* and causes the alkalization of the culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(2), 897-905. doi:10.1007/s00253-014-6130.

Denis, F., Bingen, E., Martin C., Ploy M.C and Quentin, R. (2011). Bactériologie Médicale. 2nd Edn., Elsevier Masson, Paris, ISBN: 9782294725944, Pages: 640.

Directive 2009/32/CE du parlement européen et du conseil du 23 avril 2009 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les solvants d'extraction utilisés dans la fabrication des denrées alimentaires et de leurs ingrédients.

Dohou, N., Tahrouch, S., Hassani, LMI., Badoc, A., Gmira, N., Yamni, K. (2003). Screening phytochimique d'une endémique ibéro-marocaine, *Thymelya lythroïdes.*, Bull. Soc. Pharm. Bordeaux, 142, 61-78.

Donovan, J. L., Crespy, V., Manach, C., Morand, C., Besson, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2001). Catechin Is Metabolized by Both the Small Intestine and Liver of Rats. *The Journal of Nutrition*, 131(6), 1753-1757.

Drużyńska, B., Stepniewska, A. et Wolosiak, R. (2007). The influence of time and type of solvent on efficiency of the extraction of polyphenols from green tea and antioxidant properties obtained extracts. *acta sci.pol. technol. aliment.* 6 (1), 27-36

Duda-Chodak, A., Tarko, T., Statek, M. (2008). The Effect of Antioxidants on *Lactobacillus Casei* Cultures. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria* 7: 39-51.

El Ajjouri, M., Ghanmi, M., Satrani, B., Amarti, F., Rahouti, M., Aafi, A., . . . Farah, A. (2010). Composition chimique et activité antifongique des huiles essentielles de *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. et *Thymus ciliatus* (Desf.) Benth. contre les champignons de pourriture du bois. *Acta Botanica Gallica*, 157(2), 285-294. doi:10.1080/12538078.2010.10516206.

El-Ahwal, R., Abo El-kher, S. E., & Hattem, H. (2019). Quality and Shelf Life of Labneh as Affected by Using some Essential Oils. *Journal of Food and Dairy Sciences*, 10(4), 135-139. doi:10.21608/jfds.2019.36189.

Elumalai, P., & Lakshmi, S. (2016). Role of Quercetin Benefits in Neurodegeneration. *Advances in neurobiology*, 12, 229–245. https://doi.org/10.1007/978-3-319-28383-8_12.

Références bibliographiques

Farnworth, E. R., Mainville, I., Desjardins, M. P., Gardner, N., Fliss, I., & Champagne, C. (2007). Growth of probiotic bacteria and bifidobacteria in a soy yogurt formulation. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 174-181.

FDA, (2009). Milk and cream products and yogurt In Federal Register/Vol. 74, No. 10. Food and Drug Administration. USA.

Fernandes, F. H., & Salgado, H. R. (2016). Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical reviews in analytical chemistry*, 46(3), 257–265. <https://doi.org/10.1080/10408347.2015.1095064>.

Filannino, P., Gobbetti, M., De Angelis, M., & Di Cagno, R. (2014). Hydroxycinnamic acids used as external acceptors of electrons: an energetic advantage for strict lyhetero fermentative lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 80(24), 7574-7582. doi:10.1128/aem.02413-14

Fleming HP, McFeeters RF, Daeschel MA. (1985). The lactobacilli, pediococci, and leuconostocs: vegetable products. In: Gilliland SE (ed) Bacterial starter cultures of foods. CRC Press Inc, Boca Raton, pp 97–118

Foda, MI., El-Sayed, MA., Hassan, AA., Rasmy, NM and El-Moghazy, MM. (2010). Effect of spearmint essential oil on chemical composition and sensory properties of white cheese. *Journal of American Science* 6 272–279.

Franz, C.M., Huch, M., Abriouel, H., Holzapfel, W. & Galvez, A. (2011). Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 125–140.

Fresco, P., Borges, F., Marques, M. P., & Diniz, C. 2010. The anticancer properties of dietary polyphenols and its relation with apoptosis. *Current pharmaceutical design*, 16(1), 114–134. <https://doi.org/10.2174/138161210789941856>.

Gahruie, H. H., Eskandari, M. H., Mesbahi, G., & Hanifpour, M. A. (2015). Scientific and technical aspects of yogurt fortification : A review. *Food Science and Human Wellness*, 4(1), 1–8.

Gahruie, H.H., Eskandari, M.H., Mesbahi, G., Hanifpour, M.A., 2015. Scientific and technical aspects of yogurt fortification: a review. *FSHW* 4 (1), 1–8.

Gavaric, N., Mozina, S. S., Kladar, N., & Bozin, B. (2015). Chemical Profile, Antioxidant and Antibacterial Activity of Thyme and Oregano Essential Oils, Thymol and Carvacrol and Their Possible Synergism. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(4), 1013-1021. doi:10.1080/0972060X.2014.971069.

Gedikoğlu, A., Sökmen, M., & Çivit, A. (2019). Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. *Food science & nutrition*, 7(5), 1704–1714. <https://doi.org/10.1002/fsn3.1007>.

Georgakouli, K., Mpesios, A., Kouretas, D., Petrotos, K., Mitsagga, C., Giavasis, I., & Jamurtas, A. Z. (2016). The Effects of an Olive Fruit Polyphenol-Enriched Yogurt on Body Composition, Blood Redox Status, Physiological and Metabolic Parameters and Yogurt Microflora. *Nutrients*, 8(6). doi:10.3390/nu8060344.

Références bibliographiques

Georgala, A., Tsakalidou, E., Kandarakis, I., & Kalantzopoulos, G. J. L. (1995). Flavour production in ewe's milk and ewe's milk yoghurt, by single strains and combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, isolated from traditional Greek yoghurt. *75*, 271-283.

Georgé, S., Brat, P., Alter, P., & Amiot, M. J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *J Agric Food Chem*, *53*(5), 13701373. doi:10.1021/jf048396b.

Gertenbach, D.D. (2001). Solid-liquid extraction technologies for manufacturing nutraceuticals from botanicals. In: Shi J, Mazza G, Le Maguer M, editors. *Functional foods: Biochemical and processing aspects*. Boca Raton, FL: CRC Press Inc; p. 361-6.

Gharibzahedi, S. M. T., & Chronakis, I. S. (2018). Cross linking of milk proteins by microbial trans glutaminase: Utilization in functional yogurt products. *Food Chemistry*, *45*, 620-632.

Gil-Rodríguez, A.M., Carrascosa, A.V. & Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, *64*, 1156-1162.

Ginovart, M., López, D., Valls, J., & Silbert, M. (2002). Simulation modelling of bacterial growth in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, *73*(2), 415-425. doi:https://doi.org/10.1016/S0168-1605(01)00668-7.

Goh, YJ and Klaenhammer TR .2009. Genomic features of *Lactobacillus* species. *Front Biosci* *14*:1362-1386. doi:10.2741/3313.

Gonçalves, G. M. S., Bottaro, M., & Nilson, A. C. J. R. d. C. F. B. e. A. (2012). Effect of the *Thymus vulgaris* essential oil on the growth of *Streptococcus mutans*. *32*, 375-380.

González-Cebrino, F., Durán, R., Delgado-Adámez, J., Contador, R., & Ramírez, R. (2013). Changes after high-pressure processing on physicochemical parameters, bioactive compounds, and polyphenol oxidase activity of red flesh and peel plum purée. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *20*, 34-41. doi:https://doi.org/10.1016/j.ifset.2013.07.008.

Granato, D., Nunes, D. S., & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: A proposal. *Trends in Food Science & Technology*, *62*, 13-22. doi:https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.12.010.

Grespan, R., Aguiar, R. P., Giubilei, F. N., Fuso, R. R., Damião, M. J., Silva, E. L., Mikcha, J. G., Hernandez, L., Bersani Amado, C., & Cuman, R. K. (2014). Hepatoprotective Effect of Pretreatment with *Thymus vulgaris* Essential Oil in Experimental Model of Acetaminophen-Induced Injury. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, *2014*, 954136. <https://doi.org/10.1155/2014/954136>.

Grover, S., Rashmi, H.M., Srivastava, A.K., Batish, V.K., 2012. Probiotics for human health—new innovations and emerging trends. *Gut Pathog.* *4* (1), 15.

Références bibliographiques

Guarner, F., Perdigon, G., Corthier, G., Salminen, S., Koletzko, B., & Morelli, L. (2005). Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr*, 93(6), 783-786. doi:10.1079/bjn20051428.

Guignard, J.L. (2000). Biochimie végétale. 2^{ème} édition, l'abrégé Dunod, Paris, 177-185.
Gürakan, G.C., Cebeci, A., Özer, B., 2009. Probiotic dairy beverages: microbiology and technology. In: Development and Manufacture of Yogurt and Other Functional Dairy Products. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 165–197.

Gurib-Fakim, A., Gueho, J. (1997). Inventaire et étude des plantes médicinales et des plantes aromatiques des Etats de l'océan Indien, Rapport ethnobotanique et phytochimique sur le projet PLARM, Projet FED – COI.

Gutiérrez-Grijalva, E. G.-G. P., Ambriz-Pérez, D. L., Leyva-López, N., Castillo-López, R. I., & Heredia, J. B. (2015). Biodisponibilidad de compuestos fenólicos dietéticos: Revisión. *Revista Española de Nutrición Humana y Dietética*, 20(2). doi:10.14306/renhyd.20.2.184.

Gutiérrez-Grijalva, E. P., Ambriz-Pere, D. L., Leyva-Lopez, N., Castillo-Lopez, R. I., & Heiedia, J. B. (2016). Review: dietary phenolic compounds, health benefits and bioaccessibility. *Arch Latinoam Nutr*, 66(2), 87-100.

Hammes, W.P and Vogel R.F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In *The Genera of Lactic Acid Bacteria* (eds Wood, B.J.B and Holzapfel, W.H.). Chapman & Hali, Dordrecht, Netherlands, pp.19-49.

Hammes, W.P., Weiss, N. and Holzapfel, W.P. (1991). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications* (eds Balows, A., Triiper, H.G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.H.). Springer, New York, USA, pp. 1535-1594.

Harborne J. B. (1986). Nature, distribution and function of plant flavonoids. *Progress in clinical and biological research*, 213, 15–24.

Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96(2), 67-202. doi:https://doi.org/10.1016/S0163-7258(02)00298-X.

Hayek, S.A. and Ibrahim, S.A. (2013). Current Limitations and Challenges with Lactic Acid Bacteria: A Review. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 73-87. <http://dx.doi.org/10.4236/fns.2013.411A010>.

Hernández-Ledesma, B., García-Nebot, M.J., Fernández-Tomé, S., Amigo, L., Recio, I., 2014. Dairy protein hydrolysates: peptides for health benefits. *Int. Dairy J.* 38 (2), 82–100.

Hervet-Hernández, D., Pintado, C., Rotger, R., & Goñi, I. (2009). Stimulatory role of grape pomace polyphenols on *Lactobacillus acidophilus* growth. *International Journal of Food Microbiology*, 136(1), 119-122. doi:https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.016.

Hollman, P. C. H., van Trijp, J. M. P., Buysman, M. N. C. P., v.d. Gaag, M. S., Mengelers, M. J. B., de Vries, J. H. M., & Katan, M. B. (1997). Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercétine from various foods in man. *FEBS Letters*, 418(1-2), 152-156. doi:10.1016/s0014-5793(97)01367-7.

Références bibliographiques

Hols, P., Hancy, F., Fontaine, L., Grossiord, B., Prozzi, D., Leblond-Bourget, N., . . . Kleerebezem, M. (2005). New insights in the molecular biology and physiology of *Streptococcus thermophilus* revealed by comparative genomics. *FEMS Microbiol Rev*, 29(3), 435-463. doi:10.1016/j.femsre.2005.04.008.

Hossain, M. A., Al-Raqmi, K. A. S., Al-Mijizy, Z. H., Weli, A. M., & Al-Riyami, Q. (2013). Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(9), 705-710. doi:https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60142-2.

Hossain, M. B., Brunton, N. P., Patras, A., Tiwari, B., O'Donnell, C. P., Martin-Diana, A. B., & Barry-Ryan, C. (2012). Optimization of ultrasound assisted extraction of antioxidant compounds from marjoram (*Origanum majorana* L.) using response surface methodology. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(3), 582-590. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2011.11.001>.

Hosseinzadeh, S., Kukhdan, A., Hosseini, A., Armand, R., 2015. The application of *Thymus vulgaris* in traditional and modern medicine: a review. *Glob. J. Pharmacol.* 9 (3), 260-266.

Hui, Y., Evranuz, E. (2012). Handbook of Animal-Based Fermented Food and Beverage Technology. Boca Raton: CRC Press, <https://doi.org/10.1201/b12084>.

Hunaefi, D., Riedel, H., Akumo, D. N., Gruda, N., & Smetanska, I. (2013). Effect of Lactic Acid Bacteria Fermentation on Rosmarinic Acid and Antioxidant Properties of in vitro Shoot Culture of *Orthosiphon aristatus* as a Model Study. *Food Biotechnology*, 27(2), 152-177. doi:10.1080/08905436.2013.781948.

Hussein, G.A.M., Desouky, M.M. & Soryal, K.A. (2013). Preparation and properties of fermented goat's and camel's milk beverages. *Egyptian Journal of Dairy Science*, 41, 45-57.

Hutkins, R. W. (2006). Microbiology and Technology of Fermented Foods. IFT Press. Blackwell Publishing Ltd. Iowa. pp.3-49.

Hwang, H.-J., Lee, J.-H. J. (2006). Quality characteristics of curd yogurt with *Rubus coreanum* Miquel juice. *12(2)*, 195-205.

IDF (2015). *World Dairy Situation 2015*, Document No. 481, International Dairy Federation, Brussels.

Ignat, I., Volf, I., & Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.026.

Imhof, R., & O, B. J. (1994). Quantitative GC-MS analysis of volatile flavor compounds in pasteurized milk and fermented milk products applying a standard addition method. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 27, 265-269.

Iqbal, M.Z., Qadir, M.I., Hussain, T., Janbaz, K.H., Khan, Y.H., Ahmad, B., 2014. Probiotics and their beneficial effects against various diseases. *Pak. J. Pharm. Sci.* 27 (2).

Jacobo-Velázquez, D. A., Castellanos-Dohnal, G., Caballero-Mata, P., & Hernández-Brenes, C. (2013). Biochemical changes during the storage of high hydrostatic pressure

Références bibliographiques

processed avocado puree in the presence of natural antioxidants. *CyTA - Journal of Food*, 11(4), 379-391. doi:10.1080/19476337.2013.775185.

Javed, H., Khan, M. M., Ahmad, A., Vaibhav, K., Ahmad, M. E., Khan, A., Ashafaq, M., Islam, F., Siddiqui, M. S., Safhi, M. M., & Islam, F. (2012). Rutin prevents cognitive impairments by ameliorating oxidative stress and neuro inflammation in rat model of sporadic dementia of Alzheimer type. *Neuroscience*, 210, 340–352.

Jerez, M., Pinelo, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2006).Influence of extraction conditions on phenolic yields from pine bark: Assessment of procyanidins polymerization degree by thiolysis. *Food Chemistry*. 94 (3): 406-414. doi: 10.1016/j.foodchem.2004.11.036.

Joint FAO WHO. (2003).*Codex alimentarius* : Standard for fermented milks. CXS 243-2003. World Health Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome.

Jokovic N, Nikolic M, Begovic J, Jovcic B, Savic D, Topisirovic L. (2008).A survey of the lactic acid bacteria isolated from Serbian artisanal dairy product kajmak. *Int J Food Microbiol*127(3):305–311. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.026

Kahkeshani, N., Farzaei, F., Fotouhi, M., Alavi, S. S., Bahramsoltani, R., Naseri, R., Momtaz, S., Abbasabadi, Z., Rahimi, R., Farzaei, M. H., & Bishayee, A. (2019).Pharmacological effects of gallic acid in health and diseases: A mechanistic review. *Iranian journal of basic medical sciences*, 22(3), 225–237. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.32806.7897>.

Kang, C.-G., Hah, D.-S., Kim, C.-H., Kim, Y.-H., Kim, E., & Kim, J.-S. (2011).Evaluation of antimicrobial activity of the methanol extracts from 8 traditional medicinal plants. *Toxicological research*, 27(1), 31-36. doi:10.5487/TR.2011.27.1.031.

Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *Lebensmittel-Wissenschaft + [i.e. und] Technologie. Food science + technology. Science + technologie alimentaire*, 44(4), 1065-1072. doi:10.1016/j.lwt.2010.12.009.

Karaaslan, M., Ozden, M., Vardin, H., & Turkoglu, H. (2011). Phenolic fortification of yogurt using grape and callus extracts. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 1065-1072. doi:https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.12.009.

Kemperman, R. A., Bolca, S., Roger, L. C., & Vaughan, E. E. (2010). Novel approaches for analysing gut microbes and dietary polyphenols: challenges and opportunities. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 11), 3224–3231. <https://doi.org/10.1099/mic.0.042127-0>.

Khan, F., Niaz, K., Maqbool, F., Ismail Hassan, F., Abdollahi, M., Nagulapalli Venkata, K. C., Nabavi, S. M., & Bishayee, A. (2016). Molecular Targets Underlying the Anticancer Effects of Quercetin: An Update. *Nutrients*, 8(9), 529. <https://doi.org/10.3390/nu8090529>.

Khurana, S., Venkataraman, K., Hollingsworth, A., Piche, M., & Tai, T. C. (2013). Polyphenols: benefits to the cardiovascular system in health and in aging. *Nutrients*, 5(10), 3779–3827. <https://doi.org/10.3390/nu5103779>.

Références bibliographiques

Kinnear, S. H., Fabbro, L. D., & Duivenvoorden, L. J. (2008). Variable growth responses of water thyme (*Hydrillaverticillata*) to whole-cell extracts of *Cylindrospermopsis raciborskii*. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 54(2), 187–194. <https://doi.org/10.1007/s00244-007-9026-0>.

Kivilompolo, M., & Hyötyläinen, T. (2007). Comprehensive two-dimensional liquid chromatography in analysis of Lamiaceae herbs: Characterisation and quantification of antioxidant phenolic acids. *Journal of Chromatography A*, 1145(1), 155-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.090>.

Klaenhammer, TR and de Vos WM. (2011). An incredible scientific journey. The evolutionary tale of the lactic acid bacteria. In :Ledeboer A, Hugenholtz J, Kok J, Konings W, Wouters J (eds) The 10th LAB symposium. Thirty years of research on lactic acid bacteria. 24 Media Labs, pp 1–11.

Kling, DN., Marcial, GE., Roberson, DN., Lorca, GL., Gonzalez, CF. (2016). The synergistic contribution of lactobacillus and dietary phytophenols in host health. In V Rao (Ed.). Probiotics and prebiotics in human nutrition and health, Intechopen, London.

Kohiyama, C. Y., Yamamoto Ribeiro, M. M., Mossini, S. A. G., Bando, E., Bomfim, N. d. S., Nerilo, S. B., . . . Machinski, M. (2015). Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chemistry*, 173, 1006-1010. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.135>.

Kohiyama, C.Y., Yamamoto Ribeiro, M.M., Mossini, S.A.G., Bando, E., Bomfim, N.d.S., Nerilo, S.B., 2015. Antifungal properties and inhibitory effects upon aflatoxin production of *Thymus vulgaris* L. by *Aspergillus flavus* Link. *Food Chem.* 173, 1006–1010.

Kok, C. R., & Hutkins, R. (2018). Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutr Rev*, 76(Suppl 1), 4-15. doi:10.1093/nutrit/nuy056.

Köksal, E., Bursal, E., Gülçin, İ., Korkmaz, M., Çağlayan, C., Gören, A. C., & Alwasel, S. H. (2016). Antioxidant activity and polyphenol content of Turkish thyme (*Thymus vulgaris*) monitored by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(3), 514-525. doi:10.1080/10942912.2016.1168438.

Kongo, J.M. & Malcata, F.X. (2016). Acidophilus milk. Encyclopedia of Food and Health (eds. B. Caballero, P.M. Finglas and F. Toldra), Vol. A-Che, pp. 6–14, Elsevier, London.

kowalski r and wawrzykowski j (2009). Essential oils analysis in dried materials and granulates obtained from *Thymus vulgaris* L., *Salvia officinalis* L., *Mentha piperita* L. and *Chamomilla recutita* L., *Flavour Fragr. J.*, 24: 31–5.

Kra, A.K.M.(2001). Evaluation et amélioration par séquençage chromatographique d'une action antifongique de MISC A contre *Aspergillus fumigatus*. *Thèse de doctorat 3ème cycle UFR Biosciences.Univ. Abidjan.*, pp : 126.

Krumbeck, J. A., Maldonado-Gomez, M. X., Ramer-Tait, A. E., & Hutkins, R. W. (2016). Prebiotics and synbiotics: dietary strategies for improving gut health. *Curr Opin Gastroenterol*, 32(2), 110-119. doi:10.1097/mog.0000000000000249.

Références bibliographiques

Kuete, V. (2017).Chapter 28 - Thymus vulgaris. In V. Kuete (Ed.), *Medicinal Spices and Vegetables from Africa* (pp. 599-609): Academic Press.

Kuhnle, G., Spencer, J. P. E., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K. S., . . . Hahn, U. (2000).Resveratrol Is Absorbed in the Small Intestine as Resveratrol Glucuronide. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 212-217. doi:<https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.2750>.

Kulišić, T., Dragović-Uzelac, V., Miloš, M. (2006).Antioxidant Activity of Aqueous tea infusions prepared from oregano, thyme and wild Thyme. *Food Technology and Biotechnology* 44 : 08.

Lee, C. P. D., Hsiu, S. L., & Hou, Y. C. (2002).Flavonoids in herbs: Biological fates and potential interactions with xenobiotics. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(4). doi:10.38212/2224-6614.2738.

Lee, K.G., Shibamoto, T., 2002. Determination of antioxidant potential of volatile extracts isolated from various herbs and spices. *J. Agric. Food Chem.* 50 (17), 4947–4952.

Lee, S.-J., Hwang, J.-H., Lee, S., Ahn, J., & Kwak, H.-S. (2007).Property changes and cholesterol-lowering effects in evening primrose oil-enriched and cholesterol-reduced yogurt. *International Journal of Dairy Technology*, 60(1), 22-30. doi:10.1111/j.1471-0307.2007.00294.x.

Leroy F, De Vuyst L. (2004).Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, 15(2), 67-78. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2003.09.004>

Leroy F, Verluypen J, De Vuyst L.(2006). Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol* 106(3):270–285.doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.06.027

Li, B. B., Smith, B., & Hossain, M. M. (2006). Extraction of phenolics from citrus peels: I. Solvent extraction method. *Separation and Purification Technology*, 48(2), 182-188. doi:<https://doi.org/10.1016/j.seppur.2005.07.005>.

Li, C., & Schluesener, H. (2017). Health-promoting effects of the citrus flavanone hesperidin. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57(3), 613–631. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.9063820>.

Li, C., Song, J., Kwok, L. Y., Wang, J., Dong, Y., Yu, H., . . . Chen, Y. (2017). Influence of *Lactobacillus plantarum* on yogurt fermentation properties and subsequent changes during post fermentation storage. *J Dairy Sci*, 100(4), 2512-2525. doi:10.3168/jds.2016-11864.

Li, X. D., Yang, L., Xu, S. Q., Li, J. G., Cheng, Z. H., & Dang, J. Z. (2011). [Extraction and analysis of chemical components of essential oil in *Thymus vulgaris* of tissue culture]. *Zhong Yao Cai*, 34(10), 1544-1548.

Liu SN, Han Y, Zhou ZJ .(2011) .Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Res Int* 44(3):643–651. doi:10.1016/j.foodres.2010.12.034

Liu, W. Y., Liou, S. S., Hong, T. Y., & Liu, I. M. (2017). Protective Effects of Hesperidin (Citrus Flavonone) on High Glucose Induced Oxidative Stress and Apoptosis in a Cellular Model for Diabetic Retinopathy. *Nutrients*, 9(12), 1312. <https://doi.org/10.3390/nu9121312>.

Références bibliographiques

- Lucey, J. A., & Singh, H. (1997).** Formation and physical properties of acid milk gels: a review. *Food Research International*, 30(7), 529-542. doi:[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(98\)00015-5](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(98)00015-5).
- Luhata P., Kanangila A. B., Kitawa E. K., Mulungulungu D., Lumbu J. B., Kalonda E., (2008).** Étude chimique de l'espèce *Jacobinia carnea.*, Université de Lubumbashi.
- Luque de Castro, M. D., & Priego-Capote, F. (2010).** Soxhlet extraction : Past and present panacea. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2383-2389.
- Maher, P., Akaishi, T., & Abe, K. (2006).** Flavonoid fisetin promotes ERK-dependent long-term potentiation and enhances memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(44), 16568–16573. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607822103>.
- Mahmoodi, M., Ayoobi, F., Aghaei, A., Rahmani, M., Taghipour, Z., Hosseini, A., . . . Sankian, M. (2019).** Beneficial effects of *Thymus vulgaris* extract in experimental autoimmune encephalomyelitis: Clinical, histological and cytokine alterations. *Biomed Pharmacother*, 109, 2100-2108. doi:10.1016/j.biopha.2018.08.078.
- Majeed, M., Hussain, A. I., Chatha, S. A. S., Khosa, M. K. K., Kamal, G. M., Kamal, M. A., . . . Liu, M. (2016).** Optimization protocol for the extraction of antioxidant components from *Origanum vulgare* leaves using response surface methodology. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(3), 389-396. doi:<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.04.010>.
- Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Rémésy, C., & Jiménez, L. (2004).** Polyphenols: food sources and bioavailability. *The American journal of clinical nutrition*, 79(5), 727–747. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., & Rémésy, C. (2005).** Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *The American journal of clinical nutrition*, 81(1 Suppl), 230S–242S. <https://doi.org/10.1093/ajcn/81.1.230S>.
- Mandal, S., DebMandal, M., 2016.** Chapter 94—thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. In: Preedy, V.R. (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Academic Press, San Diego, pp. 825–834.
- Mansouri, N., Aoun, L., Dalichaouche, N., & Hadri, D. (2018).** Yields, chemical composition, and antimicrobial activity of two Algerian essential oils against 40 avian multidrug-resistant *Escherichia coli* strains. *Veterinary world*, 11(11), 1539–1550. doi :10.14202/vetworld.2018.1539-1550.
- Marculescu, A., Vlase, L., Hanganu, D., Dragulescu, C., Antonie, I., Nelikinga, O. (2008).** Polyphenols analyses from *Thymus* species. *Proceedings of the Romanian Academy Series B10* : 117–121.
- Marshall, V. M. (1993).** Flavour compounds in fermented milks. *Journal of the Society of Dairy Technology*, 46, 49–56.
- Martin, R., Adams, M. O. M. (2008).** *Food microbiology* (3rd ed) : RSC Publishing. England.

Références bibliographiques

- Martins, A., Barros, L., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Fernandes, I. P., Barreiro, F., & Ferreira, I. C. (2014).** Phenolic extracts of *Rubus ulmifolius* Schott flowers: characterization, microencapsulation and incorporation into yogurts as nutraceutical sources. *Food Funct*, 5(6), 1091-1100. doi:10.1039/c3fo60721f 10⁸
- Max, B., Salgado, J. M., Cortés, S., & Domínguez, J. M. (2010).** Extraction of phenolic acids by alkaline hydrolysis from the solid residue obtained after prehydrolysis of trimming vine shoots. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(3), 1909–1917. <https://doi.org/10.1021/jf903441d>.
- Michael, M., Phebus, R. K., & Schmidt, K. A. (2010).** Impact of a plant extract on the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in nonfat yogurt. *International Dairy Journal*, 20(10), 665-672.
- Miladi, H., Slama, R., Mili, D., Zouari, S., Bakhrouf, A., Ammar, E., 2013.** Essential oil of *Thymus vulgaris* L. and *Rosmarinus officinalis* L.: gas chromatography-mass spectrometry analysis, cytotoxicity and antioxidant properties and antibacterial activities against food borne pathogens. *Nat. Sci.* 5, 729–739.
- Monagas, M., Urpi-Sarda, M., Sánchez-Patán, F., Llorach, R., Garrido, I., Gómez-Cordovés, C., Andres-Lacueva, C., & Bartolomé, B. (2010).** Insights into the metabolism and microbial biotransformation of dietary flavan-3-ols and the bioactivity of their metabolites. *Food & function*, 1(3), 233–253. <https://doi.org/10.1039/c0fo00132e>.
- Monnet V, Latrille E, Béal C, et Corrieu G. (2008).** Croissance et propriétés fonctionnelles des bactéries lactiques. In Corrieu G et Luquet F.M. Bactéries lactiques de la génétique aux ferments. Tec & Doc, Lavoisier. Paris, pp. 512-592.
- Moradi, P. (2014).** Use of metabolomics to study water deficit stress on the medicinal plant thyme. Dissertation thesis. School of Biosciences. A thesis submitted to the University of Birmingham for the degree of. Doctor of Philosophy. England.
- Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006).** Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free radical research*, 40(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>.
- Moroh, JLA., Bahi, C., Dje, K., Loukou, YG., Guede-Guina, F. (2008).** Study of the antibacterial activity of *Morinda morindoi* des (Baker) milne redheat (rubiaceae) acetatique extract (ACE) on in-vitro growth of *Escherichia coli* strains. *Bulletin de la Société Royale des Sciences Liège* 77: 44-61.
- Motarjemi Y. (2002).** Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *Int J Food Microbiol* 75(3):213–229. doi:10.1016/S0168 1605(01)00709-7
- Moyle, C (2011).** Polyphenols in apples and their interactions with vascular endothelial cells. Dissertation thesis. Institute of Food Research. A thesis submitted to the University of East Anglia for the degree of. Doctor of Philosophy. May 2011. England.
- Nabavi, S.M., Marchese, A., Izadi, M., Curti, V., Daglia, M., Nabavi, S.F., 2015.** Plants belonging to the genus *Thymus* as antibacterial agents: from farm to pharmacy. *Food Chem.* 173, 339–347.

Références bibliographiques

Nagaoka, S. (2019).Yogurt Production. *Methods Mol Biol*, 1887, 45-54. doi :10.1007/978-1-4939-8907-2_5.

Nahla, T. K., Wisam, H. M., & Tariq, N. M. (2017). Antioxidant Activities of Thyme Extracts. *Pakistan Journal of Nutrition*, 17(1), 46-50. doi:10.3923/pjn.2018.46.50.

Narvhus, J. A., & Abrahamsen, R. K. (2021). Yogurt: Types and Manufacture. In P. L. H. Mc Sweeney & J. P. McNamara (Eds.), *Encyclopedia of Dairy Sciences (Third Edition)* (pp. 502-510). Oxford: Academic Press.

Nateqi, M., & Mirghazanfari, S. M. (2018). Determination of total phenolic content, antioxidant activity and antifungal effects of *Thymus vulgaris*, *Trachyspermum ammi* and *Trigonella foenum-graecum* extracts on growth of *Fusarium solani*. *Cellular and Molecular Biology*, 64(14). doi:10.14715/cmb/2018.64.14.7.

Newall, C.A., Anderson, L.A., Phillipson, J.D., 1996. Herbal medicines: a guide for health-care professionals. The Pharmaceutical Press, London. pp. 256–257.

Nieto, G. (2020).A Review on Applications and Uses of *Thymus* in the Food Industry. 9(8), 961.

Noël, Z. G., Yao, D. J., & Philippe, G. (2007).Phytochemical and pharmacological studies of alcoholic extract of *Fagopyrum macrophyllum* (Oliv) Engl (Rutaceae):chemical structure of active compound inducing antipaludic activity.

Nolkemper, S., Reichling, J., Stintzing, F.C., Carle, R., Schnitzler, P., 2006. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against herpes simplex virus type 1 and type 2 in vitro. *Planta Med.* 72 (15), 1378–1382.

O’Connell, J. E., & Fox, P. F. 2001. Significance and applications of phenolic compounds in the production and quality of milk and dairy products: a review. *International Dairy Journal*, 11(3), 103-120. doi:https://doi.org/10.1016/S0958-6946(01)00033-4.

Ocana, A., Reglero, G., 2012. Effects of Thyme extract oils (from *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, and *Thymus serpyllifolius*) on cytokine production and gene expression of ox LDL-stimulated THP-1-macrophages. *J. Obes.* 2012, 104706.

Oliveira, G., de Oliveira, A. E., da Conceição, E. C., & Leles, M. I. (2016).Multiresponse optimization of an extraction procedure of carnosol and rosmarinic and carnosic acids from rosemary. *Food chemistry*, 211, 465–473. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.05.042>.

Ono, K., Li, L., Takamura, Y., Yoshiike, Y., Zhu, L., Han, F., Mao, X., Ikeda, T., Takasaki, J., Nishijo, H., Takashima, A., Teplow, D. B., Zagorski, M. G., & Yamada, M. (2012). Phenolic compounds prevent amyloid β -protein oligomerization and synaptic dysfunction by site-specific binding. *The Journal of biological chemistry*, 287(18), 14631–14643. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.325456>.

Oreopoulou, A., Tsimogiannis, D., & Oreopoulou, V. (2019).Chapter 15 - Extraction of Polyphenols From Aromatic and Medicinal Plants : An Overview of the Methods and the Effect of Extraction Parameters. In R. R. Watson (Ed.), *Polyphenols in Plants (Second Edition)* (pp. 243-259) : Academic Press.

Références bibliographiques

Ott, A., Fay, L. B., & Chaintreau, A. (1997). Determination and origin of the aroma impact
Ozcan, M., Chalchat, J.C. (2004). Aroma profile of *Thymus vulgaris* L. growing wild in Turkey. *Bulg. J. Plant Physiol.* 30 (3-4): 68-73.

Özer, B.H., Kirmaci, H.A., 2010. Functional milks and dairy beverages. *Int. J. Dairy Technol.* 63 (1), 1–15.

Padalino, M., Perez-Conesa, D., Lopez-Nicolas, R., and Frontela-Saseta, C. (2012). Effect of fructooligosaccharides and galactooligosaccharides on the folate production of some folate-producing bacteria in media cultures or milk. *International Dairy Journal* 27: 27–33.

Park CH, Okos MR, Wankat PC. (1989). Acetone–butanol–ethanol (ABE) fermentation in an immobilized cell trickle bed reactor. *Biotechnol Bioeng* 34(1):18–29. doi:10.1002/bit.260340104

Park, S.-Y., Yoo, M.-Y., Paik, H.-D., & Lim, S.-D. (2017). Production of benzoic acid as a natural compound in fermented skim milk using commercial cheese starter. *Journal of Dairy Science*, 100(6), 4269-4275. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2016-12399>.

Pękal, A., & Pyrzynska, K. (2014). Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods*, 7(9), 1776-1782. doi:10.1007/s12161-014-9814-x.

Perna, A., Intaglietta, I., Simonetti, A., & Gambacorta, E. (2014). Antioxidant activity of yogurt made from milk characterized by different casein haplotypes and fortified with chestnut and sulla honeys. *J Dairy Sci*, 97(11), 6662-6670. doi:10.3168/jds.2013-7843.

Petrotos, K.B., Karkanta, F.K., Gkoutos, P.E., Giavasis, I., Papatheodorou, K.N and Ntontos, A.C.(2012). Production of novel bioactive yogurt enriched with olive fruit polyphenols. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 64 867–872.

Pibiri, MC. (2006). Assainissement microbiologique de l'air et des systèmes de ventilation au moyen d'huiles essentielles (Doctoral dissertation) Ecole polytechnique fédérale de Lausanne, Switzerland.

Pietta P. G. (2000). Flavonoids as antioxidants. *Journal of natural products*, 63(7), 1035–1042. <https://doi.org/10.1021/np9904509>.

Pirigharnaei, M. (2012). Comparison of essential oil composition in wild and cultivated populations of *Thymus pubescens* Boiss. & Kotschy ex Celak. from Iran. *International Journal of Plant Physiology and Biochemistry*, 4(4). doi:10.5897/ijppb12.009.

Porrini, M., & Riso, P. (2008). Factors influencing the bioavailability of antioxidants in foods: a critical appraisal. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases : NMCD*, 18(10), 647–650. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2008.08.004>.

Pourahmad, R., & Assadi, M. M. (2005). Yogurt production by Iranian native starter cultures. *Nutrition & Food Science*, 35, 410–415.

Prajapati JB, Nair BM.(2003). The history of fermented foods. In: Farnworth ER (ed) *Handbook of fermented functional foods*. CRC Press, Boca Raton, pp 1–25

Références bibliographiques

Preedy, V.R and Srirajaskanthan, V.B. (2013). Handbook of Food Fortification and Health. Humana Press, New York.

Prescott, L.M., Harley, J.P and Klein, D.A. (2003). Microbiologie. De Boeck-Supérieur. pp: 1137.

Queipo-Ortuño, M. I., Boto-Ordóñez, M., Murri, M., Gomez-Zumaquero, J. M., Clemente-Postigo, M., Estruch, R., . . . Tinahones, F. J. (2012). Influence of redwine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am J Clin Nutr*, 95(6), 1323-1334. doi:10.3945/ajcn.111.027847.

Rajha, H. N., Boussetta, N., Louka, N., Maroun, R. G., & Vorobiev, E. (2014). A comparative study of physical pretreatments for the extraction of polyphenols and proteins from vine shoots. *Food Research International*, 65, 462-468.

Ranarivelo, Y. (2004). Les Grandes familles Chimiques de Produits Naturels, Faculté des Sciences, Université d'Antananarivo.

Record, I. R., Dreosti, I. E., & McInerney, J. K. (2001). Changes in plasma antioxidant status following consumption of diets high or low in fruit and vegetables or following dietary supplementation with an antioxidant mixture. *The British journal of nutrition*, 85(4), 459–464. <https://doi.org/10.1079/bjn2000292>.

Reddy, P., Kandisa, R., Varsha, P., Satyam, S., 2014. Review on *Thymus vulgaris* traditional uses and pharmacological properties. *Med. Aromat. Plants* 3, 164.

Reineccius G. 2006. Flavor chemistry and technology. Boca Raton, FL, USA : CRC Press.

Reverón, I., de las Rivas, B., Matesanz, R., Muñoz, R., & López de Felipe, F. (2015). Molecular adaptation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 to gallic acid revealed by genome-scale transcriptomic signature and physiological analysis. *Microb Cell Fact*, 14, 160. doi:10.1186/s12934-015-0345-y

Rezac, S., Kok, C. R., Heermann, M., & Hutkins, R. (2018). Fermented Foods as a Dietary Source of Live Organisms. *Frontiers in microbiology*, 9, 1785. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01785>.

Rezatofighi, S.E., Seydabadi, A., SeyyedNejad, S.M., 2014. Evaluating the efficacy of *Achillea millefolium* and *Thymus vulgaris* extracts against Newcastle Disease Virus *in vivo*. Jundishapur J. Microbiol. 7 (2), e9016.

Rice-Evans C. (2001). Flavonoid antioxidants. *Current medicinal chemistry*, 8(7), 797–807. <https://doi.org/10.2174/0929867013373011>.

Ríos J. L. (2010). Effects of triterpenes on the immune system. *Journal of ethnopharmacology*, 128(1), 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.12.045>.

Ríos, J. L., & Recio, M. C. (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100(1), 80-84. doi:https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025.

Rizk, A. M., Hammouda, F. M., Ismail, S. I., Hassan, N. M., El-Missiry, M. M., & Ahmad, F. A. (1990). Constituents of plants growing in Qatar. *Plant Foods for Human Nutrition*, 40(1), 1-3. doi :10.1007/BF02193774.

Robinson, R.K. (2002). Yogurt types and manufacture. Encyclopedia of dairy sciences. Academic Press ; London, UK.

Références bibliographiques

Roby, M. H. H., Sarhan, M. A., Selim, K. A.-H., &Khalel, K. I. (2013). Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. *Industrial Crops and Products*, 43, 827-831. doi:<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.08.029>.

Rodríguez-Rojo, S., Visentin, A., Maestri, D., &Cocero, M. J. (2012). Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *Journal of Food Engineering*, 109(1), 98-103. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.09.029>.

Ross, J. A., & Kasum, C. M. (2002). Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annual review of nutrition*, 22, 19–34.

Saad, B., Bari, M. F., Saleh, M. I., Ahmad, K., &Talib, M. K. M. (2005). Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in food stuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1073(1), 393-397. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.10.105>.

Sadeghi Ekbatan, S., Iskandar, M. M., Sleno, L., Sabally, K., Khairallah, J., Prakash, S., &Kubow, S. (2018). Absorption and Metabolism of Phenolics from Digests of Polyphenol-Rich Potato Extracts Using the Caco-2/HepG2 Co-Culture System. *Foods (Basel, Switzerland)*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.3390/foods7010008>.

Sahan, N., Yasar, K., &Hayaloglu, A. A. (2008). Physical, chemical and flavor quality of non-fat yogurt as affected by a β -glucanhydro colloidal composite during storage. *Food Hydrocolloids*, 22(7), 1291-1297. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.06.010>.

Saidj, F.2006.Extraction de l'huile essentielle de thym : *Thymus numidicus kabylica*- Thèse de magistère en Technologie des hydrocarbures, Département génie des procédés chimiques et pharmaceutiques; université M'Hamed Bougara – Boumerdes.

Sanders, M. E., Akkermans, L. M. A., Haller, D., Hammerman, C., Heimbach, J. T., Hörmannspenger, G., &Huys, G. (2010). Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*, 1(3), 164-185. doi:10.4161/gmic.1.3.12127.

Sanders, M. E., D. C. Walker, K. M. Walker, K. Aoyama, and T. R. Klaenhammer. (1996). Performance of commercial cultures in fluid milk applications. *J. Dairy Sci.* 79:943–955.

Saxelin, M., Korpela, R., &Mäyrä-Mäkinen, A. (2003). Introduction: classifying functional dairy products. In T. Mattila-Sandholm & M. Saarela (Eds.), *Functional Dairy Products* :1-16, Woodhead Publishing.

Scalbert, A., & Williamson, G. (2000). Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *The Journal of nutrition*, 130(8S Suppl), 2073S–85S. <https://doi.org/10.1093/jn/130.8.2073S>.

Scalbert, A., Morand, C., Manach, C., &Rémésy, C. (2002). Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(6), 276-282. doi:[https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00205-6).

Schmidt, J.L., Tourneur ,C. et Lenoir ,J. (1994). Fonction et choix des bacteries lactiques laitieres in «bacteries lactiques ». Vol II. DE ROISSART H. et LUQUET F.M. Ed. Lorica, paris.

Références bibliographiques

Sert, D., Mercan, E., & Dertli, E. (2017). Characterization of lactic acid bacteria from yogurt-like product fermented with pine cone and determination of their role on physicochemical, textural and microbiological properties of product. *LWT-Food Science and Technology*, 78, 70–76.

Shahidi, F., Ambigaipalan, P., 2016. Beverages fortified with omega-3 fatty acids, dietary fiber, minerals, and vitamins. In: *Handbook of Functional Beverages and Human Health*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 801–813.

Shan, B., Cai, Y. Z., Brooks, J. D., & Corke, H. (2011). Potential application of spice and herb extracts as natural preservatives in cheese. *Journal of medicinal food*, 14(3), 284–290. <https://doi.org/10.1089/jmf.2010.0009>.

Sharifi-Rad, M., Varoni, E. M., Iriti, M., Martorell, M., Setzer, W. N., Del Mar Contreras, M., Salehi, B., Soltani-Nejad, A., Rajabi, S., Tajbakhsh, M., & Sharifi-Rad, J. (2018). Carvacrol and human health: A comprehensive review. *Phytotherapy research : PTR*, 32(9), 1675–1687. <https://doi.org/10.1002/ptr.6103>.

Sharma, R., & Padwad, Y. (2020). Plant polyphenol-based second-generation symbiotic agents: Emerging concepts, challenges, and opportunities. *Nutrition*, 77, 110785. doi:<https://doi.org/10.1016/j.nut.2020.110785>.

Shi, J., Jianmei, Y., Pohorly, J., Young, J.C., Bryan, M., Wu, Y. (2003). Optimization of the extraction of polyphenols from grape seed meal by aqueous ethanol solution. *J Food Agric Environ*;1(2):42–7.

Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drum stick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *J Agric Food Chem*, 51(8), 2144–2155. doi:10.1021/jf020444+.

Siebert, K. J., Troukhanova, N. V., & Lynn, P. Y. (1996). Nature of polyphenol-protein interactions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(1), 80–85. doi:10.1021/jf9502459.

Sienkiewicz, M., Lysakowska, M., Cieciewicz, J., Denys, P., Kowalczyk, E., 2011. Antibacterial activity of thyme and lavender essential oils. *Med. Chem.* 7 (6), 674–689.

Silva, L. V., Nelson, D. L., Drummond, M. F. B., Dufossé, L., & Glória, M. B. A. (2005). Comparison of hydrodistillation methods for the deodorization of turmeric. *Food Research International*, 38(8), 1087–1096. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.025>.

Sofowora, A., Ogunbodede, E., & Onayade, A. (2013). The role and place of medicinal plants in the strategies for disease prevention. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM*, 10(5), 210–229. <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.2>

Stahl-biskup, E. & Sàez, F. (2002). Thyme :The genus *Thymus*. London and New York, Taylor & Francis. pp 331.

Stahl-Biskup, E., Venskutonis, R.P., 2012. Thyme. In: Peter, K.V. (Ed.), *Handbook of Herbs and Spices*. second ed. Woodhead Publishing, Abington, Cambridge, UK, pp. 499–525.

Références bibliographiques

Sultana, B., Anwar, F., & Ashraf, M. (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 14(6), 2167–2180. <https://doi.org/10.3390/molecules14062167>.

Sun, Y. Z., Chen, J. F., Shen, L. M., Zhou, J., & Wang, C. F. (2017). Anti-atherosclerotic effect of hesperidin in LDLr^{-/-} mice and its possible mechanism. *European journal of pharmacology*, 815, 109–117. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2017.09.010>.

Sun-Waterhouse, D., Zhou, J., & Wadhwa, S. S. (2013). Drinking yoghurts with berry polyphenols added before and after fermentation. *Food Control*, 32(2), 450-460. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.01.011>.

Tabasco, R., Sánchez-Patán, F., Monagas, M., Bartolomé, B., Victoria Moreno-Arribas, M., Peláez, C., & Requena, T. (2011). Effect of grape polyphenols on lactic acid bacteria and bifidobacteria growth: resistance and metabolism. *Food Microbiol*, 28(7), 1345-1352. doi:10.1016/j.fm.2011.06.005.

Tamime AY .(2002). Fermented milks: a historical food with modern applications—a review. *Eur J Clin Nutr* 56(suppl 4):S2–S15

Tamime AY, Robinson RK .(1999). Biochemistry of fermentation. In: Tamime AY, Robinson RK (eds) *Yoghurt science and technology*, 2nd edn. CRC Press, Cambridge

Tamime AY, Robinson RK. (2007). Biochemistry of fermentation In *Yoghurt: Science and technology*. Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, England.

Tamin, A. Y., & Robinson, R. K. (1999). *Yogurt science and technology* (2 ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.

Tavakoli, A., Sahari, M. A., & Barzegar, M. (2017). Antioxidant activity of Berberis integerrima seed oil as a natural antioxidant on the oxidative stability of soy bean oil. *International Journal of Food Properties*, 20(sup3), S2914-S2925. doi:10.1080/10942912.2017.1382509.

Teixeira, P. (2014). LACTOBACILLUS | *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. In C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)* (pp. 425-431). Oxford : Academic Press.

Thorning, T.K., Raben, A., Tholstrup, T., Soedamah-Muthu, S.S., Givens, I., Astrup, A. (2016). Milk and dairy products: good or bad for human health? An assessment of the totality of scientific evidence. *Food Nutr. Res.* 60 (1), 32527.

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A., Nazemi, J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Phytomedicine* 17 (2), 142–145.

Urkek, B., Sengul, M. & Erkaya, T. (2014). Use of *Saccharomyces boulardii* in fermented dairy products. *Akademik Gida*, 12(2), 108–113.

Valdés, L., Cuervo, A., Salazar, N., Ruas-Madiedo, P., Gueimonde, M., & González, S. (2015). The relationship between phenolic compounds from diet and microbiota: impact on human health. *Food Funct*, 6(8), 2424-2439. doi:10.1039/c5fo00322a.

Références bibliographiques

Van Duynhoven, J., Vaughan, E. E., Jacobs, D. M., Kemperman, R. A., van Velzen, E. J., Gross, G., Roger, L. C., Possemiers, S., Smilde, A. K., Doré, J., Westerhuis, J. A., & Van de Wiele, T. (2011). Metabolic fate of polyphenols in the human super organism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108 Suppl 1*(Suppl 1), 4531–4538. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000098107>.

Vieira da Silva, B., Barreira, J. C. M., & Oliveira, M. B. P. P. (2016). Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. *Trends in Food Science & Technology*, *50*, 144-158. doi:<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.12.007>.

Vodnar, D. C., & Socaciu, C. (2012). Green tea increases the survival yield of Bifidobacteria in simulated gastrointestinal environment and during refrigerated conditions. *Chem Cent J*, *6*(1), 61. doi:10.1186/1752-153x-6-61.

Walstra, P. Walstra, J.T. Wouters, T.J. Geurts, (2010). Dairy science and technology: CRC press.

Webb, A. R., Kline, L., & Holick, M. F. (1988). Influence of season and latitude on the cutaneous synthesis of vitamin D3: exposure to winter sunlight in Boston and Edmonton will not promote vitamin D3 synthesis in human skin. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *67*(2), 373–378. <https://doi.org/10.1210/jcem-67-2-373>.

Westfall, S., Lomis, N., & Prakash, S. (2018). Longevity extension in *Drosophila* through gut-brain communication. *Sci Rep*, *8*(1), 8362. doi:10.1038/s41598-018-25382-z.

WHO/FAO, World Health Organisation and Food and Agricultural Organisation of the United Nations, (2011) .Codex Alimentarius, Milk and Milk Products, second ed. <http://www.fao.org/docrep/015/i2085e/i2085e00.pdf>.

Xi, J., Shen, D., Zhao, S., Lu, B., Li, Y., & Zhang, R. (2009). Characterization of polyphenols from green tea leaves using a high hydrostatic pressure extraction. *International journal of pharmaceuticals*, *382*(1-2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2009.08.023>.

Xie, Y., Chen, J., Xiao, A., & Liu, L. (2017). Antibacterial Activity of Polyphenols: Structure-Activity Relationship and Influence of Hyperglycemic Condition. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *22*(11), 1913. <https://doi.org/10.3390/molecules22111913>.

Yamauchi, R., Maguin, E., Horiuchi, H., Hosokawa, M., & Sasaki, Y. (2019). The critical role of urease in yogurt fermentation with various combinations of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *J Dairy Sci*, *102*(2), 1033-1043. doi:10.3168/jds.2018-15192.

Yang, J., Ji, Y., Park, H., Lee, J., Park, S., Yeo, S., . . . Holzapfel, W. H. (2014). Selection of functional lactic acid bacteria as starter cultures for the fermentation of Korean leek (*Allium tuberosum* Rottler ex Sprengel.). *Int J Food Microbiol*, *191*, 164-171. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2014.09.016.

Yang, R. Y., Lin, S., & Kuo, G. (2008). Content and distribution of flavonoids among 91 edible plant species. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, *17 Suppl 1*, 275–279.

Références bibliographiques

Yang, Y., & Zhang, F. (2008). Ultrasound-assisted extraction of rutin and quercetin from *Euonymus alatus* (Thunb.) Sieb. *Ultrasonics sonochemistry*, 15(4), 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2007.05.001>.

Yildiz, A., Erdp an, S., Saydut, A., &Hamamci, C. J. F. A. M. (2011). High-Performance Liquid Chromatography Analysis and Assessment of Benzoic Acid in Yogurt, Ayran, and Cheese in Turkey. 5, 591-595.

Zhang Y, Zhang L, Du M, Yi H, Guo C, Tuo Y, Han X, Li J, Zhang L, Yang L. (2011).Antimicrobial activity against *Shigella sonnei* and probiotic properties of wild lactobacilli from fermented food. *Microbiol Res* 167(1):27–31. doi:10.1016/j.micres.2011.02.006

Zhang, Q., Ren, J., Zhao, H., Zhao, M., Xu, J., & Zhao, Q. (2011). Influence of casein hydrolysates on the growth and lactic acid production of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. *International Journal of Food Science &Technology*, 46(5), 1014-1020. doi :10.1111/j.1365-2621.2011.02578.x.

Zhou, E., Fu, Y., Wei, Z., Yu, Y., Zhang, X., Yang, Z. (2014). Thymol attenuates allergic airway inflammation in ovalbumin (OVA)-induced mouse asthma. *Fitoterapia* 96, 131–137.

Zhou, K., & Yu, L. (2004).Effects of extraction solvent on wheat bran antioxidant activity estimation. *LWT - Food Science and Technology*, 37(7), 717-721. doi:10.1016/j.lwt.2004.02.008.

Złotek, U., Mikulska, S., Nagajek, M., &Świeca, M. (2016). The effect of different solvents and number of extraction steps on the polyphenol content and antioxidant capacity of basil leaves (*Ocimum basilicum* L.) extracts. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 628-633. doi :<https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.08.002>.

Annexes

**REGULAR ARTICLE**

Production and quality assessment of a set-style yogurt fortified with low concentrations of *Thymus vulgaris* L phenolic extracts

Haroune Khelifi^{1*}, Djamel Ait Saada¹, Ahmed Mohamed Ali Bekada², Nafissa Dehimeche³

¹Laboratory of Food Technology and Nutrition, University of Mostaganem, 27000, Algeria

²Biology department, University center of Tissemsilt, 38000, Algeria

³Department of agronomy University of Mostaganem, 27000, Algeria

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 17 Mar 2019

Revised: 27 Apr 2019

Accepted: 29 Apr 2019

***Corresponding Author:**

Email:

haroune.khelifi@univ-mosta.dz

Telephone: 00213671118200

Keywords: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, Phenolic extracts, Set-style yogurt, *Thymus vulgaris* L, *Streptococcus thermophilus*

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the effect of *Thymus vulgaris* L phenolic extracts (TVPE) on the growth of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, and the impact of their addition in small amounts (2-8%) to a set-style yogurt with regard to variations in physico-chemical, bacteria count and organoleptic properties during 21 days storage at 4°C. The phenolic components were extracted from the crushed aerial parts of the test plant by cold maceration in hydro-methanolic solution (methanol: water, 80:20 v/v). The plant polyphenolic profile was determined by HPLC. The survival ability of yogurt starter cultures in the presence of TVPE was evaluated through the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The total phenolic content (TPC) was $20.2 \pm 0.57 \mu\text{g GAE} / \text{mg extract}$. The amount of flavonoid compounds was $39.83 \mu\text{g EQ/mg extract}$. As the quantitative measurements revealed, apigenin and fisetin ($8.17, 6.83, \mu\text{g GAE} / \text{mg extract}$ respectively) emerged as major phenolic compounds from thyme aerial parts. The MIC and MBC against the growth of both lactic bacteria were obtained at 60% of TVPE concentration. A significant ($p < 0.01$) changes in pH, titrable acidity and apparent viscosity were observed in all experimental yogurts. The best scores of sensory evaluation were recorded in samples added with 2% and 4% of TVPE as well as the control. Based on collected data, 2% and 4% of TVPE can be incorporated into yogurt without risk of deterioration in physicochemical quality or inhibition of lactic bacteria.

1. Introduction

The current tendency of consumers to seek out healthier diets and the need to replace synthetic antioxidants by natural ones have led to the use of new ingredients such as polyphenols (PPs) (Tavakoli et al., 2018). PPs are phyto-active micro-nutrients synthesized by plants and belong to their secondary metabolites, which, in most cases, are

used in plant defense mechanisms to counteract the deleterious effects of reactive oxygen species (ROS) on cell metabolism (Perna et al., 2014; Gutierrez-Grijalva et al., 2016). The high antioxidant capacity of phenolic compounds can positively affect human health by reducing the risks of certain disorders such as cancer, diabetes, and cardiovascular diseases (Sun-Waterhouse et al., 2013; Perna et al., 2014). This is why it is strongly recommend-